



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE
BEJA**



**Escola Superior Agrária
Mestrado de Engenharia Alimentar**

**Azeite Virgem Extra macerado com *Tuber melanosporum*,
Boletus edulis e adição de partículas de ouro comestível**

Jacinto José Malveiro Mestre

**Beja
2017**

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado de Engenharia Alimentar

**Azeite Virgem Extra macerado com *Tuber melanosporum*,
Boletus edulis e adição de partículas de ouro comestível**

**Tese de Mestrado, realizada na empresa C.A.B.B (Cooperativa Agrícola de Beja e Brinches),
apresentada na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja**

Elaborado por:

Jacinto José Malveiro Mestre

Orientado por:

Doutora Isabel Baer

Beja

2017

*Dedico este trabalho a
todos os que nunca
deixaram de acreditar em
mim.....*

Agradecimentos

A concretização desta tese de mestrado só foi possível graças ao apoio e ajuda prestada, direta ou indiretamente, de várias pessoas às quais eu gostaria de expressar o meu sincero agradecimento, em particular.

À professora Doutora Isabel Baer, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela disponibilidade demonstrada desde o primeiro momento, por nunca me ter deixado desistir nos momentos difíceis e por toda a simpatia com que sempre me tratou.

Ao professor Doutor Nuno Bartolomeu, pela disponibilidade em ajudar no tratamento estatístico dos dados e no esclarecimento de dúvidas que iam surgindo.

A todos os Docentes do Mestrado de Engenharia Alimentar e Engenheiros da área, que nunca negaram um pedido de esclarecimento e disponibilizaram todos os equipamentos para realizar algumas das minhas análises.

À Cooperativa Agrícola de Beja e Brinches (C.A.B.B), na pessoa do Gerente Sr. Aníbal Martins e do Eng. António Brito, a facilidade na obtenção do azeite virgem e de todas as informações necessárias para a concretização deste grande projeto.

À Empresa Portuguesa “Aromas & Boletos” sediada em Leiria, em concreto ao seu proprietário Norberto Costa que me forneceu os cogumelos *Boletus edulis* e que tem as mais modernas técnicas de desenvolvimento de micélios, substratos e micorrizas e que comercializam todos os produtos e serviços para produção de cogumelos exóticos e silvestres.

Durante o estágio não só adquiri experiência técnica e profissional como também tive oportunidade de conhecer pessoas que conquistaram a minha admiração e me transmitiram muitos dos seus conhecimentos.

Resumo

O ensaio tem como principal objetivo o desenvolvimento de novos produtos em Portugal, a partir da criação de Azeites Virgem Extra aromatizados, macerados com Trufa Negra (*Tuber melanosporum*) e Cogumelos (*Boletus edulis*) e com posterior adição de partículas de ouro comestível. Serão testadas duas percentagens de produto (4% e 8%) e dois períodos de maceração (45 e 90 dias). Na segunda fase do ensaio serão adicionadas partículas de ouro comestível às amostras de azeite selecionadas e será testada a sua resistência oxidativa, através da exposição contínua à luz artificial, por um período de 30 dias, para avaliar a influência deste elemento metálico no tempo de prateleira destes produtos quando expostos nas superfícies comerciais. Após esta etapa caracterizar-se-ão quimicamente as diferentes amostras de azeite. Concluiu-se que a adição de partículas de ouro e a adição dos aromatizantes desidratados não acelerou a degradação dos azeites, tendo mesmo beneficiado os produtos pelo aumento do seu conteúdo em carotenos.

Palavras-chave: azeite virgem extra, *Tuber melanosporum*, *Boletus edulis*, ouro comestível, caracterização química.

Abstract

The main objective of the essay is the development of new products in Portugal, from the creation of Extra Virgin Olive Oil flavored, macerated with Black Truffle (*Tuber melanosporum*) and Mushrooms (*Boletus edulis*) and with subsequent addition of edible gold particles. Two product percentages (4% and 8%) and two maceration periods (45 and 90 days) will be tested. In the second phase of the test, edible gold particles will be added to the selected olive oil samples and their oxidative resistance will be tested through continuous exposure to artificial light for a period of 30 days to evaluate the influence of this metallic element on the shelf life when exposed to commercial surfaces. After this step the different olive oil samples will be chemically characterized. It was concluded that the addition of gold particles and the addition of the dehydrated flavorings did not accelerate the degradation of the oils, and even benefited the products by increasing their content in carotenes.

Keywords: Extra virgin oil, *tuber melanosporum*, *Boletus edulis*, edible gold, chemical characterization.

Índice geral

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice geral.....	v
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas.....	ix
Introdução	1
Capítulo 1. Azeite virgem	3
1.1. A dieta mediterrânica e o azeite virgem	3
1.2. Classificação do Azeite	7
1.3. Composição	10
1.3.1. Fração maioritária	10
1.3.2. Fração minoritária	13
Capítulo 2. Reações de Degradação do Azeite	21
2.1. Oxidação	21
2.1.1. Fatores de deterioração do azeite.....	21
2.1.2. Fatores Externos que Influenciam a Oxidação.....	22
2.1.3. Auto-Oxidação	23
2.1.4. Foto-Oxidação.....	25
2.1.5. Oxidação enzimática	26
2.1.6. Acção dos antioxidantes	27
2.2. Hidrólise	28
Capítulo 3. Azeites Aromatizados.....	29
3.1. Definição de Azeites Aromatizados	29
3.2. Propriedades dos Aromatizantes	30

v

3.3. Ervas e Especiarias Utilizadas em Azeites Aromatizados	31
3.4. Boletus edulis.....	31
3.5. Tuber melanosporum.....	33
3.6. Ouro Comestível (E175 aditivo alimentar de luxo).....	36
3.7. Desenvolvimento de novos produtos.....	39
Capítulo 4. Parte Experimental	41
4.1. Objetivos	41
4.2. Material e métodos	42
4.2.1. Amostragem.....	42
4.2.2. Percentagem de acidez	45
4.2.3. Índice de Peróxidos	46
4.2.4. Absorvância no ultra violeta	46
4.2.5. Cor	47
4.2.6. Compostos fenólicos totais	47
4.2.7. Pigmentos clorofilinos e carotenóides	49
4.2.8. Estabilidade oxidativa (Rancimat).....	50
4.3. Análise estatística	50
4.3.1. Análise descritiva e análise de variância.....	50
4.3.2. Tratamento estatístico dos resultados	51
4.4. Resultados e Discussão	52
4.4.1. Percentagem de acidez	54
4.4.2. Índice de peróxidos	55
4.4.3. Índices espectrofotométricos (K232 e K268)	56
4.4.4. Estabilidade oxidativa Rancimat	59
4.4.5. Compostos fenólicos totais	60
4.4.6. Pigmentos Carotenoides e Clorofilinos	61

4.4.7. Cor	64
4.5. Criação da marca e estratégia de Marketing.....	68
Capítulo 5. Conclusões	69
Bibliografia	71

Índice de figuras

Figura 1 - Representação em pirâmide da dieta mediterrânea.	7
Figura 2 - Principais ácidos gordos presente no azeite.	10
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do glicerol e ácido gordo, e a formação do triglicérido.....	11
Figura 4 - Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis.....	15
Figura 5 - Estrutura química da clorofila (a e b).....	18
Figura 6 - Estrutura química de alguns carotenóides presentes em azeites.....	18
Figura 7 - Estrutura química do β -sitosterol.	19
Figura 8 - Cogumelo (<i>Boletus edulis</i>).....	32
Figura 9 - Trufa Negra (<i>Tuber melanosporum</i>) utilizada no ensaio.....	36
Figura 10 - Ouro Comestível (E175 aditivo alimentar de luxo).	38
Figura 11 - Processo de maceração no laboratório de vinho e azeite do IPBeja.	42
Figura 12 – Esquematização do delineamento experimental.....	44
Figura 13 - Ensaio dos azeites macerados com Trufas, <i>Boletus</i> e adição de ouro.	52
Figura 14 - Valores médios dos resultados das determinações da percentagem de acidez.	55
Figura 15 - Valores médios dos resultados da determinação do índice de Peróxidos. ...	56
Figura 16 - Valores médios dos resultados das determinações do K232.	58
Figura 17 - Valores médios dos resultados das determinações do K268.	58
Figura 18 - Valores médios dos resultados das determinações da estabilidade oxidativa (<i>Rancimat</i>).....	60
Figura 19 - Valores médios dos resultados das determinações de Polifenóis Totais.	61
Figura 20 - Valores médios dos resultados das determinações dos Pigmentos carotenóides.	63
Figura 21 - Valores médios dos resultados das determinações dos Pigmentos clorofilinos.	64
Figura 22 - Valores médios dos resultados das determinações do parâmetro L^*	65
Figura 23 - Valores médios dos resultados das determinações do parâmetro a^*	66
Figura 24 - Valores médios dos resultados das determinações do parâmetro b^*	67

Índice de tabelas

Tabela 1 - Características dos azeites e óleos de bagaço de azeitona.de 2013.....	9
Tabela 2 - Limites na composição em ácidos gordos.	11
Tabela 3 - Trigliceridos mais abundantes no azeite.....	12
Tabela 4 - Limites da composição esterólica em azeites.....	20
Tabela 5 - Valor Nutricional dos Boletus edulis (por 100g).....	33
Tabela 6 - As Várias Variedades de Trufas	35
Tabela 7 - Valores Nutricionais da Tufa Negra para 100 g de (Tuber melanosporum). ..	36
Tabela 8 – Codificação das amostras.	43
Tabela 9 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Azeite Macerado, referentes as análises químicas.....	53

x

J. Mestre (2017). Azeite Virgem Extra macerado com *Tuber melanosporum*,
Boletus edulis e adição de partículas de ouro comestíveis.

Introdução

De entre todos os óleos comestíveis, o azeite virgem tem vindo nas últimas décadas a tomar um lugar de destaque, devido aos benefícios para a saúde e às características organoléticas que advêm da sua composição. Esta é influenciada por vários aspetos como sejam as boas práticas de manipulação, colheita, armazenamento e processamento. (Baer, 2006).

As características químicas, biológicas, nutricionais e organoléticas fazem do azeite um produto ímpar e muito apreciado. É um produto tradicional da cozinha mediterrânica que confere um gosto e aroma únicos à alimentação, podendo ser usado em cru, ou para cozinhar, especialmente benéfico pelo facto de resistir as agressões provocadas pela temperatura. (Baer, 2012).

As condições de armazenamento do azeite são muito importantes e é necessário cuidado para evitar a oxidação, que tem um efeito negativo nas características do produto embalado. (Baer, 2006).

O azeite tem sido, ao longo dos séculos, amplamente utilizado na cozinha mediterrânica. Das diversas categorias comerciais de azeite virgem, o virgem extra é aquele com melhor aceitabilidade por parte dos consumidores. As características químicas e organoléticas do azeite têm sido reconhecidamente comprovadas. A composição em ácidos gordos, com elevados teores de ácido oleico e o equilíbrio entre os ácidos gordos saturados e polinsaturados, está intimamente relacionada com os benefícios nutricionais atribuídos a esta gordura. Por outro lado, uma vez que é geralmente consumido cru, o azeite apresenta quantidades consideráveis de antioxidantes naturais (Moldão-Martins, et al., 2004). Apesar da sua riqueza em compostos antioxidantes, o azeite virgem é suscetível de sofrer oxidação lipídica, perdendo qualidades nutricionais e organoléticas (Issaoui, et al., 2011).

A estabilidade do produto é cada vez mais importante e um azeite que oxide facilmente será inaceitável para os consumidores (Baer, 2006).

A origem dos azeites aromatizados parece derivar de práticas de processamento e

conservação antigas, onde os azeites adquiriam desta forma o sabor correspondente do aromatizante, e eram posteriormente usados na confeção de pratos de culinária e saladas (Gambacorta, et al., 2007).

No caso do azeite virgem são exequíveis diversas vias para proceder à sua aromatização. Por um lado, parte dos aromatizantes, por exemplo: laranja, limão, alho, entre outros, podem ser adicionados durante o processo de extração do azeite, fazendo com que no processo de moenda e termobatedura ocorra a passagem do agente aromatizante para o azeite (Baiano et al., 2010). Contudo, o processo mais usual é após extração do azeite a adição direta do agente aromatizante ao mesmo. Por difusão há passagem dos aromas do agente para o azeite. Esta aromatização pretende melhorar o valor nutricional, modificar as características sensoriais e, por vezes, aumentar o tempo de prateleira (Antoun & Tsimidou, 1997).

Hoje em dia, o sector olivícola português tem necessidade de se afirmar no mercado nacional e internacional, uma vez que a concorrência externa é forte e especializada. Para isso tem recorrido à inovação deste produto, tornando-o mais atrativo, e contribuindo para a inovação do sector. No mercado português e internacional, já existem alguns azeites aromatizado com diversas especiarias, nomeadamente, alho, orégãos, citrinos, ou mesmo partículas de ouro. Neste ensaio os agentes aromatizantes utilizados foram as trufas Negras (*tuber melanosporum*), *Boletus Edulis* e foi adicionado também Ouro comestível no interior da embalagem, e esta é preenchida com azeite.

Pretende-se estudar se os agentes aromatizantes em causa exercem atividade ao nível da composição química e resistência à degradação do azeite. A avaliação ocorreu ao nível da composição físico-química, resistência à oxidação e atividade antioxidante.

Capítulo 1. Azeite virgem

1.1. A dieta mediterrânica e o azeite virgem

Nos países mediterrâneos o azeite virgem tem, além da importância nutricional, um grande valor socio-cultural e económico. A sua produção constitui, em varias regiões desfavorecidas, o principal suporte da atividade económica, pelo que qualquer evolução no sector olivícola esta associado a efeitos positivos na estrutura socio-económica. A necessidade de alterar os hábitos alimentares surge com o estilo de vida que a população tem vindo a adotar e com o aumento da obesidade infantil (Cunha, 2007).

Para todos os estilos de vida é importante que a população adquira bons hábitos para uma alimentação saudável associada à prática de exercício físico. Estes bons hábitos são parte integrante da dieta mediterrânica. A antiga palavra grega *diaita*, da qual deriva dieta, significa estilo de vida equilibrado, e traduz exatamente o que a dieta mediterrânica é. Muito mais do que um regime nutricional, a dieta mediterrânica traduz um estilo de vida, e não apenas um padrão alimentar, que combina ingredientes da agricultura de países da região mediterrânica, receitas e formas de cozinhar as próprias, refeições partilhadas, celebrações e tradições, que, juntamente com o exercício físico moderado, completam um estilo de vida que a ciência moderna nos convida a adotar em benefício da nossa saúde, tornando-a um excelente modelo de vida saudável. O conceito da dieta mediterrânica foi elaborado por Ancel Keys que, em 1986, publicou o resultado da sua investigação no “Seven Countries Study”. Demonstrou que havia uma estreita relação entre o consumo de gorduras e a incidência da doença coronária que era tanto mais frequente quanto mais elevado fosse o consumo de gordura. A exceção verificou-se apenas nos povos da bacia do Mediterrâneo, que apesar de terem um elevado consumo de gordura sofriam de relativamente poucos enfartes do miocárdio. Esta exceção, segundo Keys, devia-se ao tipo de gordura consumida que no Mediterrâneo era sobretudo azeite virgem (gordura mono insaturada), (Gonçalves, 2014).

Relativamente ao consumo de azeite em Portugal, de acordo com o Conselho Oleícola Internacional, verifica-se uma nítida recuperação comparativamente ao início da década de 90, em que o consumo *per capita* se situava em 3,3 kg, atingindo em 2013 um valor

próximo dos 7,1 kg *per capita*. Este aumento de consumo não será seguramente alheio à “redescoberta” do azeite virgem como produto natural, saudável e com inúmeros benefícios para a saúde (Gonçalves, 2014; APN, 2017).

O consumo significativo de azeite virgem está relacionado com os benefícios para a saúde e as características organoléticas que advêm da sua composição, sendo estas as principais responsáveis pela qualidade do azeite. Contém elementos nutricionais importantes, tais como vitaminas e antioxidantes, mas é composto sobretudo por triacilglicerois (99%), ácidos gordos livres, mono e diacilglicerois, hidrocarbonetos, esteróis, álcoois alifáticos, tocoferóis, pigmentos, bem como outros compostos fenólicos e compostos orgânicos voláteis (Custodio, 2009).

O segmento de azeites de especialidade é um nicho de mercado que, começa a ter alguma relevância na classificação do azeite, pois inclui azeites selecionados com embalagens mais atrativas e adição de outros componentes. Aromatizar o azeite é uma das especialidades que invocam inovação no sector. Em termos industriais já existe uma vasta gama de azeites aromatizados com ervas, alho, cebola, cogumelos, citrinos entre outros. Estes novos azeites exigem técnicas de linha de produção, sofisticadas para monitorizar processos e avaliar a sua composição e qualidade (Fernandes M. O., 2010).

Cerca de 98% do peso total do azeite é essencialmente formado por triacilglicerídeos (TAGs). Contém ainda outros compostos que representam aproximadamente 2% do peso total, nos quais estão contidas mais de 230 substâncias. Entre estas podem encontrar-se ácidos gordos livres, monoglicerídeos, diglicerídeos e outros constituintes não glicéricos, nomeadamente álcoois alifáticos e triterpénicos, esteróis, tocoferóis, fosfolípidos, pigmentos, hidrocarbonetos e polifenóis (Fernandes M. O., 2010).

Efeitos benéficos do azeite

Nos últimos anos o número de casos reportados sobre as propriedades benéficas do azeite tem aumentado. Na Grécia, Itália e Espanha os casos de cancro do cólon e próstata, bem como doenças coronárias tem diminuído, e supõe-se que esta diminuição esteja relacionada com o fato de estes povos possuírem uma alimentação que tem como base a dieta mediterrânea, que apresenta como principal fonte de gordura o azeite (Tuck, 2002). Os benefícios que advém do consumo de azeite estão relacionados com a sua composição química, nomeadamente com o seu teor em ácidos gordos, em particular pela elevada percentagem de ácido oleico e também pela presença de compostos com atividade antioxidante, compostos fenólicos e tocoferóis (Gunstone, 2002; Gouveia, et al., 2002).

Estudos realizados por Kris Etherton (1999) e Trautwein, *et al.*, (1999) relatam que os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) presentes na dieta possuem um efeito superior contra a aterosclerose do que os ácidos gordos saturados (SFA), sendo comparáveis aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na prevenção do risco de doenças cardiovasculares. O ácido oleico, principal ácido gordo monoinsaturado do azeite, contribui para a diminuição do LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e para a estabilidade ou inclusive para o aumento da HDL (lipoproteínas de alta densidade) (Granados, 2000; Duarte, 2003). As LDL são menos suscetíveis à oxidação por radicais livres numa dieta rica em MUFA, isto porque os MUFA são mais estáveis e resistentes à oxidação que os PUFA. Os MUFA, em particular o ácido oleico está correlacionado com baixos níveis de LDL e níveis elevados de HDL no plasma, a elevada composição em MUFA está também relacionada com a diminuição dos fatores de risco das doenças coronária (Huang, 2008; Covas, 2007).

A dieta mediterrânica

Os benefícios de uma dieta equilibrada na saúde humana têm vindo a ser evidenciados por diversos estudos de populações e ensaios clínicos. Os dados epidemiológicos obtidos ao longo dos anos demonstram que dietas ricas em fruta, vegetais, legumes, peixe e produtos lácteos com teores baixos em gordura, estão associadas a uma menor incidência de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e de alguns tipos de cancro. A dieta mediterrânea refere-se aos padrões alimentares encontrados em áreas de crescimento de oliveira da região do mediterrâneo. O papel benéfico deste óleo alimentar foi já posto em evidência por muitos investigadores, apresentando benefícios em doenças coronárias, no metabolismo de lípidos, na regulação da pressão sanguínea, no índice de massa corporal e nos processos inflamatórios e processos de coagulação sanguíneos. O rácio de ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs) para ácidos gordos saturados (SFAs) é bastante maior em regiões onde esta dieta é seguida do que em outras regiões do globo, como o Norte da Europa ou a América do Norte (Huang, 2008; Covas, 2007).

O padrão dietético mediterrânico é normalmente apresentado graficamente, sob a forma de pirâmide (Figura 1). Da base para o topo da pirâmide vamos encontrando os alimentos que devem ser ingeridos diariamente até aos que devem ser ingeridos moderadamente ou esporadicamente. Assim, este regime alimentar sugere:

Consumo diário de cereais e produtos não refinados (como pão com grãos de cereais, arroz), vegetais, frutas, azeite (como fonte de gordura alimentar) e produtos lácteos com baixos teores de gordura (como o queijo, o iogurte e o leite). Consumo semanal de batata, peixe, azeitonas, e carne de aves. Consumo mensal de carne vermelha e seus derivados. Na dieta mediterrânica é ainda aconselhado o consumo moderado de vinho (1 a 2 copos por dia, acompanhando as refeições), (APN, 2017).

A dieta mediterrânica está relacionada com a redução do risco de desenvolvimento de síndrome metabólico, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, algumas doenças neurodegenerativas e cancros (APN, 2017).

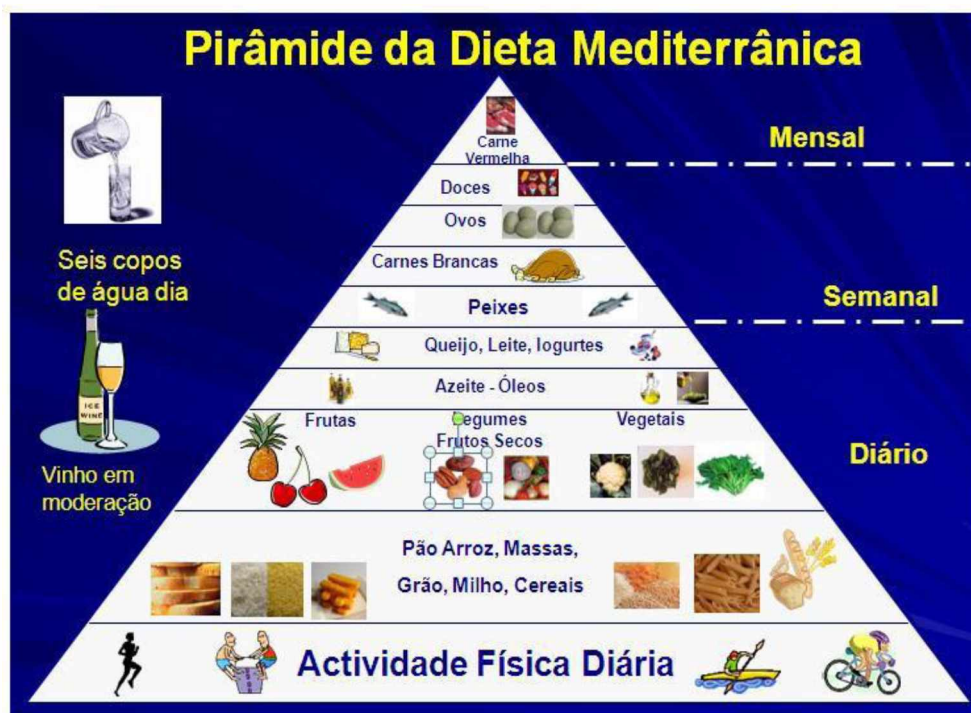


Figura 1 - Representação em pirâmide da dieta mediterrânea.

Fonte: Fundação Portuguesa de Cardiologia.

1.2. Classificação do Azeite

A União Europeia reconhece várias categorias de azeite virgem, cada uma com as suas características e valores de mercado próprios e segundo o Reg. Nº 2568/91 da Comissão Europeia, a classificação do azeite é feita, usando uma árvore de decisão, com base na percentagem de acidez, no índice de peróxidos, nas absorvâncias no ultravioleta e na análise sensorial.

O azeite virgem é obtido exclusivamente a partir de azeitonas que foram sujeitas a meios mecânicos e físicos (operações tecnológicas), sob condições térmicas que não impliquem alterações, podendo estas ser: lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Com estas características este azeite está destinado ao consumo humano e pode ser dividido em quatro categorias (Reg. Nº 2568/91 e posteriores retificações).

O azeite pode ser classificado conforme o tipo de operações a que é sujeito, de acordo com a legislação (Reg. Nº 2568/91 e posteriores retificações): Azeite virgem: o processo de obtenção recorre apenas a meios mecânicos ou físicos, sob condições que não sejam

prejudiciais, nem que alterem o azeite, nomeadamente ao nível da temperatura. Os processos envolvidos são de lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Nesta categoria incluem-se: Azeite extra virgem: apresenta um máximo de acidez livre de 0,8% (expressa em ácido oleico). Azeite virgem: máximo de acidez livre de 2%. Azeite virgem lampante: acidez livre superior a 2%; não consumível diretamente; aplicação nas indústrias de refinação, cosmética e farmacêutica. Azeite refinado: obtido após refinação do azeite virgem, com recurso a um conjunto de processos físicos e químicos, envolvendo solventes, por forma a remover acidez, cheiros e sabores desagradáveis, que não alterem a estrutura glicérica do azeite. Azeite: mistura de azeite virgem (excetuando o lampante) e azeite refinado (Casa do azeite, 2017).

Os azeites virgens e virgem extra podem fazer parte de uma denominação de origem protegida (DOP), podendo ser de agricultura biológica ou de quinta (Custódio, 2009).

Na tabela 1, podemos observar as Características dos Azeites e Óleos de bagaço de Azeitona, constantes no (Regulamento (CEE) nº 2568/91 e respetivas alterações).

O facto de o azeite virgem ser obtido a partir da polpa da fruta em vez da semente e unicamente por tratamento mecânico, a baixas temperaturas, com ausência de tratamento químico ou refinamento, torna-o diferente de todos os outros óleos da indústria alimentar. A cor do azeite está dependente dos pigmentos nele presentes durante os diversos estados de maturação, podendo ir desde o verde-amarelado até ao dourado. O azeite proveniente de azeitonas maduras apresenta uma cor dourada devido à presença de carotenoides; o azeite obtido a partir de azeitonas ainda verdes apresenta uma cor verde-amarelada devido à presença elevada de clorofilas. O sabor e o aroma do azeite advêm da presença de vários compostos voláteis, tais como aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos, bem como de compostos não voláteis, como polifenóis. O sabor depende da origem, do cultivo da oliveira, das variedades de oliveira, do método de extração do azeite e do tempo de armazenamento (Custódio, 2009).

Tabela 1 - Características dos azeites e óleos de bagaço de azeitona

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA

Categoria	Ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE) (mg/kg) (*)	Acidez (mg) (*)	Índice de peróxidos (mlq O ₂ /kg) (*)	Ceras (mg/kg) (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmatadienos (*) (mg/kg)	Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCE42 obtido por cálculo teórico (%)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₄₄ ou K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
1. Azeite virgem extra	FAEE ≤ 40 (campanha de 2013-2014) (*) FAEE ≤ 35 (campanha de 2014-2015) FAEE ≤ 30 (campanhas posteriores à de 2014-2015)	≤ 0,8	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % de ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,05	≤ [0,2]	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Azeite virgem	—	≤ 2,0	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % de ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,05	≤ [0,2]	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Azeite lampante	—	> 2,0	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 (*)	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % de ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ [0,3]	—	—	—	Md > 3,5 (*)	—
4. Azeite refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % de ácido palmítico total > 14 %	—	≤ [0,3]	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—

Fonte: Regulamento de Execução (UE) N.º 1348/2013.

Legenda: Regulamento de execução (UE) N.º 1348/2013 DA COMISSÃO de 16 de dezembro de 2013.

1.3. Composição

1.3.1. Fração maioritária

Ácidos gordos

O azeite virgem é um óleo vegetal que se diferencia de todos os outros devido ao seu elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados. O conteúdo em ácidos gordos livres é reduzido e variável, dependendo sobretudo da qualidade da matéria-prima. Os ácidos gordos livres na presença de glicerol, álcoois e terpenos, formam respetivamente triglicéridos, ceras e ésteres de terpenos ou ésteres de esteróis. Os azeites não contêm, ou contêm em pequenas quantidades, ácidos gordos ramificados, com número ímpar de carbonos ou mesmo ácidos gordos com menos de 16 e mais de 20 átomos carbonos (Harwood & Aparício, 1999). Os ácidos gordos maioritários presentes no azeite encontram-se esquematizados na figura 2.

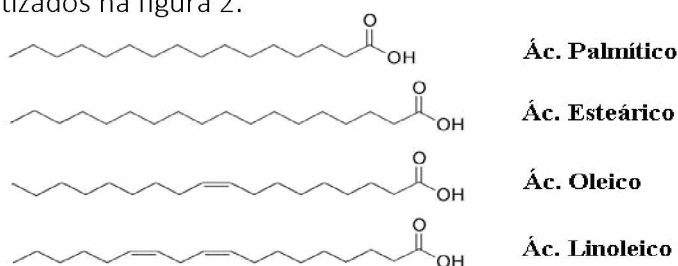


Figura 2 - Principais ácidos gordos presente no azeite.

Fonte: Harwood & Aparício, 1999.

Assim, os ácidos gordos maioritários são o oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0) e palmitoleico (C16:1). Os ácidos gordos linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenóico (C20:1), margárico (C17:0), beénico (C22:0), lignocérico (C24:0), e mirístico (C14:0) existem em menor quantidade (Sánchez, et al., 2001). A composição em ácidos gordos é um parâmetro importante em termos de qualidade. Assim o Concelho Oleícola Internacional (COI) e a União Europeia, produziram documentos legais que impõem limites (tabela 2), também para os ácidos gordos na posição *trans* para cada categoria de azeite. Os azeites virgem extra, não podem exceder para o caso do C18:1*t* e para a soma dos isómeros C18:2*t* e C18:3*t* o valor de 0,05% (Reg. (UE) n.º 61/2011; COI, 2006).

Tabela 2 - Limites na composição em ácidos gordos.

Mirístico	C14:0	≤ 0,05
Palmítico	C16:0	7,5-20,0
Palmitoleico	C16:1	0,3-3,5
Margárico	C17:0	≤ 0,3
Esteárico	C18:0	0,5-5,0
Oleico	C18:1	55,0-83,0
Linoleico	C18:2	3,5-21,0
Linolénico	C18:3	≤ 1,0
Araquídico	C20:0	≤ 0,6
Eicosenóico	C20:1	≤ 0,4
Beénico	C22:0	≤ 0,2
Lignocérico	C24:0	≤ 0,2

(% m/m ésteres de metilo) Fonte: COI, 2006.

A composição em ácidos gordos difere de amostra para amostra, dependendo da zona de produção, da altitude, do clima, da variedade, e do estado da maturação dos frutos. (Boskou, et al., 2006).

Triglicéridos

São os principais componentes da fração saponificável. Os triglicéridos são tri-ésteres derivados da união do glicerol (um tri-álcool) com ácidos gordos, no qual os grupos funcionais do glicerol (grupos hidroxilo) reagem com o ácido carboxílico dos ácidos gordos. Como é representado na figura 3. Assim, um triglicérido é formado por um conjunto de três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol (Sánchez, et al., 2001).

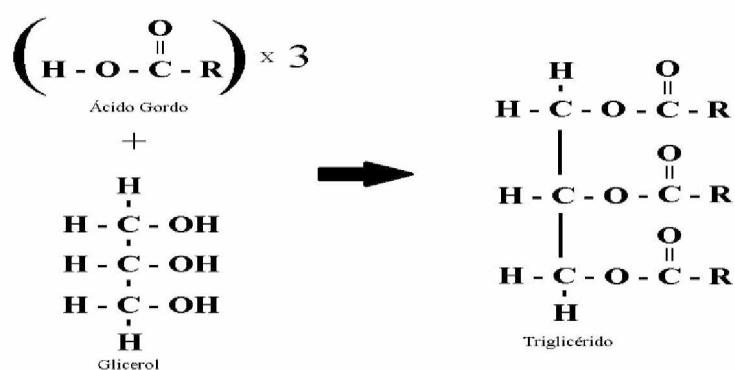


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do glicerol e ácido gordo, e a formação do triglicérido.

Fonte: (Sánchez et al., 2001).

No azeite virgem, a distribuição dos ácidos gordos nas moléculas de triglicéridos é assimétrica entre as posições do glicerol. Segundo Santinelli, et al. (1992), a distribuição dos ácidos gordos não é aleatória, mas segue um padrão na qual os ácidos gordos da posição dois, da molécula do glicerol, são insaturados, ou seja, o ácido linolénico, por exemplo, é mais favorecido frente a ácidos gordos como o oleico e linoleico, para ocupar esta posição do tri-álcool. A posição dois do glicerol é ocupada por ácidos gordos saturados quando a sua concentração total é muito elevada, o que não acontece no caso do azeite. Segundo Boskou (1996), os triglicéridos mais abundantes são expostos na tabela 3.

Tabela 3 - Trigliceridos mais abundantes no azeite.

OOO	Trioleína	40	– 59%
POO	Palmitodioleína	12	– 20%
OOL	Linoleodioleína	12.5	– 20%
POL	Palmitooleolinoleína	5.5	– 7%
SOO	Estearodioleína	3	– 7%

Fonte Boskou (1996).

Segundo Tiscornia et al. (1982), os triglicéridos trisaturados (PPP, EEE, PEP, EPE, etc.) e os triinsaturados contendo ácido linolénico (PoPoLn), não ocorrem no azeite. Observando-se que a única molécula simétrica é a trioleína (OOO).

Mono e Diglicerídeos

O azeite para além da maioria dos triglicéridos contém também glicéridos parciais. A presença de monoglicéridos e diglicéridos devem-se a hidrólises enzimáticas dos triglicéridos e a biossínteses incompletas dos mesmos (Firestone, 2005). De uma forma geral, os diglicéridos são mais abundantes que os monoglicéridos. Num azeite virgem extra, as concentrações de diglicéridos variam entre 1,0 e 2,8%, enquanto os monoglicéridos estão presentes em menos de 0,25% (Boskou, et al., 2006).

1.3.2. Fração minoritária

Os azeites e a azeitona são uma fonte natural de antioxidantes, que inclui carotenoides, tocoferóis e compostos fenólicos, que através de diferentes mecanismos atuam de forma protetora contra espécies reativas de oxigénio, funcionando como captadores de radicais livres, pela doação rápida de um átomo de hidrogénio, sendo igualmente aceitador de iões metálicos como o ferro e o cobre, com capacidade de iniciarem a produção de radicais livres. De tal forma atuam como antioxidantes mas igualmente como anti mutagénicos, impedindo a ocorrência de mutações de genes (Heinonen, 2007). O azeite é o óleo que possui maior quantidade em esqualeno (hidrato de carbono formado por 30 carbonos), o que proporciona uma ação benéfica sobre o sistema imunitário e na pele (Gouveia, et al., 2002).

Quando se avalia a qualidade de um azeite, os compostos fenólicos (como por exemplo os polifenóis ou os tocoferóis) devem de ser considerados nessa avaliação visto que a família destes compostos apresenta potencial antioxidante e contribuem significativamente para a estabilidade do azeite contra a oxidação, além de que são considerados compostos protetores contra o cancro, doenças do coração e atuam sobre o stress oxidativo (Boskou, 1998). Os compostos fenólicos estão também relacionados com as qualidades sensoriais e nutricionais do azeite (Carrasco Pancorbo, et al., 2006). Nos azeites, todos os tipos de tocoferóis estão presentes (α -tocoferol; γ -tocoferol; β -tocoferol e δ -tocoferol) no entanto o mais abundante é o α tocoferol que representa cerca de 95% do peso total de tocoferóis (Perrin, 1992). Outros compostos presentes no azeite são compostos aromáticos, que são responsáveis pelos sabores e odores dos azeites, conhecendo-se, atualmente, mais de 200 (Gouveia et al., 2002). Estão também presentes os pigmentos de clorofilas e carotenoides que são pigmentos responsáveis pela cor do alimento (Boskou, 1998). A presença destes compostos depende do fruto, de fatores genéticos (como a variedade do fruto), do grau de maturação, de condições ambientais e do próprio processo de extração e armazenamento do óleo. Os pigmentos de clorofila são os responsáveis pela cor esverdeada do azeite virgem (Kiritakis, et al., 2001).

As clorofilas e os carotenoides têm um papel importante na atividade oxidativa de alimentos processados, uma vez que funcionam com atividade anti oxidativa no escuro e atividade pró-oxidante quando expostos à luz (Giuffrida, et al., 2007; Ryan, et al., 1998). Os carotenoides, juntamente com os polifenóis e tocoferóis fornecem uma estabilidade oxidativa ao azeite e têm um efeito sinérgico de antioxidantes e anti carcinogénicos. Além das clorofilas e carotenoides, existem outros pigmentos nos azeites virgens, como a luteína e betacaroteno que são responsáveis pela cor amarelada dos azeites (Giuffrida, et al., 2007).

Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos do azeite podem ser de natureza terpénica, esterólica ou policíclica aromática (Sánchez, et al., 2001). O esqualeno e o β -caroteno são os hidrocarbonetos terpénicos mais abundantes no azeite. A presença de esqualeno no azeite é considerada como parcialmente responsável pelos efeitos benéficos para a saúde e a sua ação químiopreventiva contra certos tipos de cancro (Boskou, et al., 2006). Representa 40% do peso total da fração insaponificável (Sánchez, et al., 2001) e 90% dos hidrocarbonetos (Boskou et al., 2006). O β -caroteno, um dos responsáveis pela cor do azeite, é um terpeno de 40 átomos de carbono com concentrações de 0,5 a 4 mg/kg de azeite (Sánchez, et al., 2001). Os hidrocarbonetos de natureza esterólica existem em pequenas quantidades no azeite ($< 0,5$ mg/kg), sendo que a sua presença é associada a processos de refinação. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são muito residuais (1 a 700 μ g/kg) (Tiscornia, et al., 1982). O composto mais significativo é o estigmastadieno formado pelos processos de refinação a partir do β -sitosterol (Sánchez, et al., 2001).

Tocoferóis e Tocotrienóis

Os tocoferóis, os mais importantes fenóis lipofílicos, são compostos por um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral isoprenóide na posição 2 (figura 4). Podem contribuir para a estabilidade oxidativa dos azeites, pois têm um papel biológico importante como antioxidante, no entanto a sua ação na resistência à oxidação não é evidente. Como mostra a figura 4 os tocotrienóis apresentam três insaturações na cadeia lateral, nas posições 3, 7, e 11, distinguindo-se assim dos tocoferóis. Assim, existem 8 compostos, designados por α -, β -, γ - e δ -, sendo que o α -tocoferol representa 90 a 95% do total de

vitamina E (Sánchez, et al., 2001). Este valor está dependente da cultivar, de fatores agronômicos e também de fatores tecnológicos. Consideram que devido à melhoria das condições de extração do azeite e a implementação de programas de Boas Práticas de Fabrico tiveram um impacto positivo importante no teor de tocoferóis dos azeites, sendo que atualmente os teores observados nos azeites são superiores aos verificados no passado. Referem que os valores médios de tocoferóis e tocotrienóis rondam os 100 mg/kg de azeite Belitz, et al. (2009).

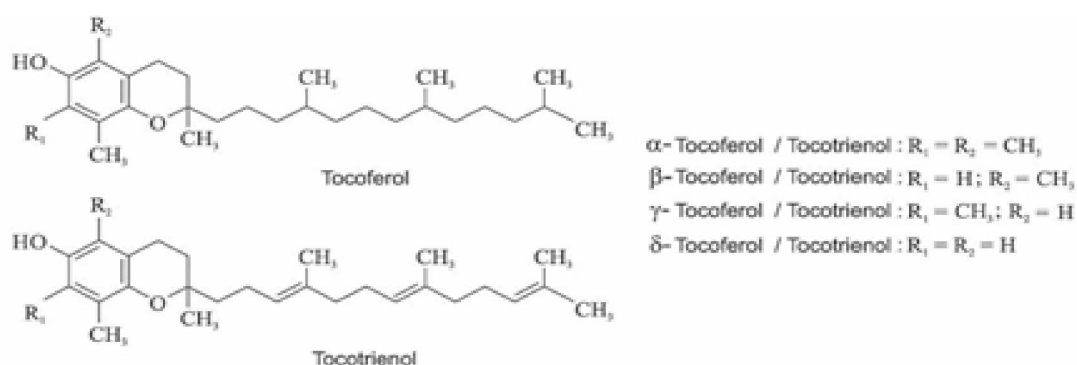


Figura 4 - Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis.

Fonte: Belitz et al,2009.

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos estão identificados como sendo responsáveis pela maior parte das propriedades antioxidantes dos azeites virgens. Estes compostos proporcionam ao azeite características únicas, uma vez que não se encontram em qualquer outro óleo vegetal (Boskou, 1996). A composição fenólica dos azeites é bastante complexa e a sua concentração média depende de vários fatores, como por exemplo estado de maturação, a cultivar, as condições de armazenamento, condições climáticas e do tipo de tecnologia utilizada na sua produção (Boskou, 2008). Estes compostos encontram-se divididos em diferentes categorias, tais como os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, secoiridóides, flavonas e lignanas (Servili, et al., 2004). O grupo dos ácidos fenólicos, presente em pequenas quantidades, foi o primeiro a ser descrito no azeite, e divide-se em dois tipos – benzóico (ácido benzóico, ácido phidroxibenzóico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido sirínico) e cinâmico (ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico). O grupo dos álcoois fenólicos é

composto maioritariamente pelo hidroxitirosol e tirosol (Bianco, et al., 1998). Os secoiridóides, juntamente com as lignanas, são os mais abundantes no azeite virgem extra, e apresentam-se na forma dialdeídica do ácido decarboximetil elenóico ligado ao hidroxitirosol ou tirosol, isómeros das agliconas da oleuropeína (princípio amargo da azeitona encontrado no azeite) e ligstrosídeo (Servili, et al., 2004). A oleuropeína, altamente concentrada na azeitona verde, é hidrolisada durante a maturação e durante o armazenamento após a colheita, produzindo várias moléculas mais simples, que caracterizam o sabor rico e complexo do azeite. Azeites ricos em compostos fenólicos são de uma maneira geral amargos e picantes. Na verdade, interações complexas entre os constituintes da fração minoritária resultam em azeites com adstringência e amargura, por vezes excessivas e desagradáveis como no caso dos azeites resultantes de azeitonas demasiado verdes. Geralmente os azeites produzidos a partir de azeitonas em estados de maturação menos avançados obtêm melhores classificações devido ao seu aroma “frutado”, “floral” e complexo, oriundo do seu alto teor de fenóis. Em síntese, os elevados níveis de fenóis conferem aos azeites uma elevada estabilidade e um sabor frutado forte (Visioli, et al., 2006). Por último, podem ser encontradas diferentes tipos de flavonas, tais como apigenina ou luteolina (Servili, et al., 2004).

O hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol ou 3,4-DHPEA) e o tirosol (*p*-hidroxifeniletanol ou *p*-HPEA) são os álcoois mais abundantes no azeite. O acetato de hidroxitirosol e o glicosídeo do hidroxitirosol também estão presentes na fração fenólica hidrofílica (Servili et al., 2004).

A concentração total de hidroxitirosol no azeite varia entre 1,4 a 14,42 mg/kg no azeite extra virgem, enquanto que no azeite refinado a concentração média é cerca de 1,74 mg/kg [36]. O tirosol e o hidroxitirosol são absorvidos de forma dependente da dose, o que os torna bons indicadores do consumo de azeite e permite a sua utilização na monitorização em estudos clínicos (Servili, et al., 2004).

Ceras

As principais ceras detetadas no azeite têm números de carbono par, ou seja, são os ésteres de ácido oleico ou palmítico de C36 a C46 átomos de carbono (Reiter & Lorbeer, 2001). Os ésteres de álcoois alifáticos de cadeia longa, vulgarmente chamados de ceras, contêm até 58 átomos de carbono, afetando as suas propriedades físicas, como o seu peso molecular elevado, ponto de fusão superior a 70°C, entre outros (Ramírez-Tortosa, et al., 2006). As ceras estão presentes na pele das azeitonas evitando a perda de água. Elas são abundantes no óleo de bagaço de azeitona e em azeite lampante. A elevada acidez dos azeites faz aumentar a quantidade de ceras, uma vez que ocorre esterificação de álcoois alifáticos com ácidos gordos livres (Ramírez-Tortosa, et al., 2006). Desta forma, este parâmetro pode ser usado como um critério para diferenciação das várias classificações de azeite. A quantidade máxima permitida em azeites virgem extra é de 250 mg/kg (Regulamento (CE) no 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003). O seu teor é afetado pela cultivar, ano de colheita, qualidade da matéria-prima e condições de processamento (Boskou, et al., 2006).

Clorofilas e Carotenóides

Os carotenoides (luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina, representados na figura 6), quimicamente chamados de terpenos são derivados do ácido mevalónico, e responsáveis pela cor amarelada dos azeites. Vários componentes são responsáveis pela cor dos azeites. As clorofilas a e b na (figura 5), e os seus produtos de oxidação, feofitinas a e b, são responsáveis pela cor esverdeada. A quantidade destes compostos é influenciada pela cultivar, índice de maturação, zona de produção, sistema de extração, e condições de armazenamento. Assim, há autores que consideram os pigmentos como um índice de qualidade, embora não exista nenhum método padronizado para a sua medição (Boskou, et al., 2006; Ramírez-Tortosa, et al., 2006; Sánchez, et al., 2001).

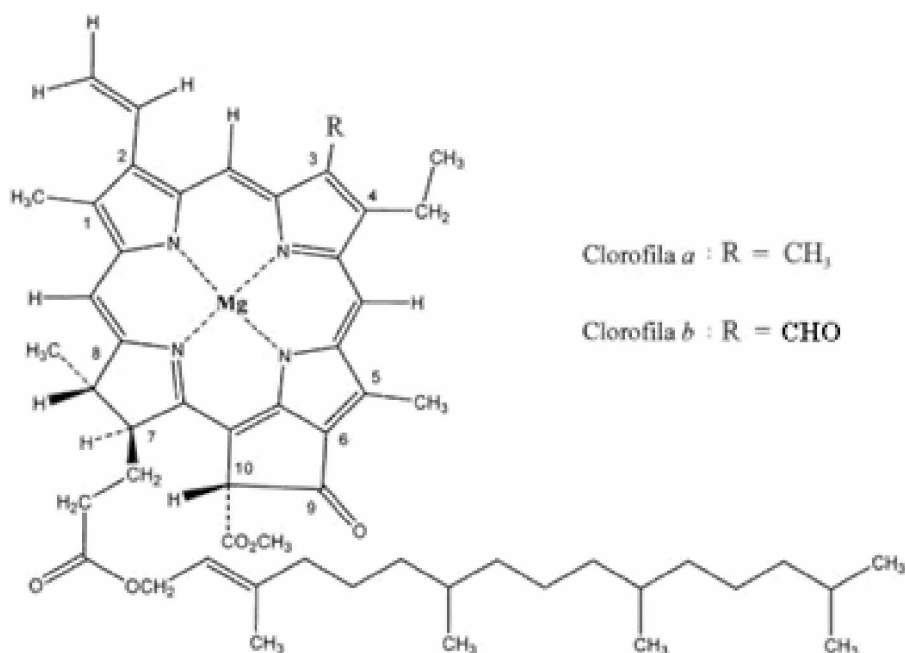


Figura 5 - Estrutura química da clorofila (a e b).

Fonte: Sánchez, et al., 2001.

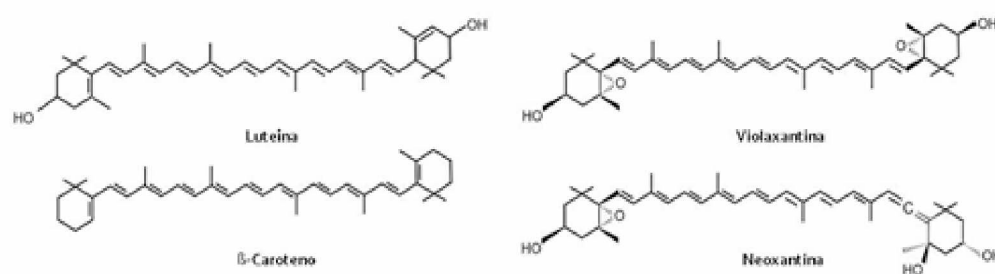


Figura 6 - Estrutura química de alguns carotenóides presentes em azeites.

Fonte: Sánchez, et al., 2001.

Álcoois Alifáticos e Triterpênicos

Os álcoois gordos são compostos lineares saturados com mais de 16 átomos de carbono. Estes tipos de álcoois encontram-se na forma livre e esterificada. Os mais importantes são os álcoois gordos e os álcoois diterpênicos (Reiter & Lorbeer, 2001). Os principais álcoois gordos presentes no azeite são o dicosanol (C22), tetracosanol (C24), hexacosanol (C26) e octacosanol (C28). Álcoois com número ímpar de carbonos estão presentes em quantidades vestigiais. Estes compostos não excedem, geralmente, os 350 mg/kg de azeite. O teor de álcoois gordos é afetado pela cultivar, condições ambientais, índice de

maturação e processamento (Sánchez, et al., 2001). Álcoois como o fitol e o geranilgeraniol são diterpenóides acíclicos presentes na fração de álcoois alifáticos do azeite sob a forma livre e esterificada (Reiter & Lorbeer, 2001). Dois dos principais álcoois triterpénicos identificados são os diálcoois triterpénicos eritrodiol e uvaol. Os álcoois triterpénicos variam de 500 a 3000 mg/kg (Ramírez-Tortosa, et al., 2006). Os teores de eritrodiol e uvaol são usados como parâmetros de qualidade. Um teor muito elevado destes diálcoois triterpénicos é um indicativo de azeites obtidos por solventes (Angerosa, et al., 2006). Segundo o Regulamento (CE) no 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003, o limite máximo de eritrodiol e uvaol é de 4,5% para todas as categorias comerciais de azeite.

Esteróis

Os compostos esterólicos são álcoois tetracíclicos biossintetizados a partir do esqualeno. Os esteróis estão presentes no azeite como álcoois livres e como ésteres de ácidos gordos (Firestone, 2005). O principal esteroide presente no azeite é o β -sitosterol (figura 7), em menores quantidades temos o estigmasterol, colesterol, 24-metilenocolesterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^5,23$ -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, $\Delta^5,24$ -estigmastadienol, Δ^7 -estigmasterol e Δ^7 -avenasterol (Sánchez, et al., 2001).

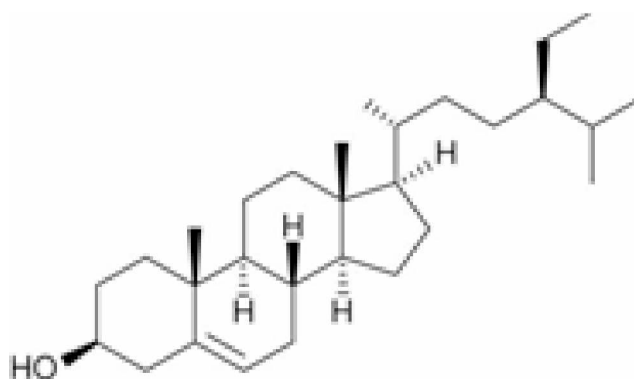


Figura 7 - Estrutura química do β -sitosterol.

Fonte: Sánchez et al., 2001.

A quantidade de esteróis pode ser usada para identificar a origem e também a pureza de um azeite. A diminuição dos esteróis durante o armazenamento tem sido associada ao aumento do valor de peróxidos (Ramírez-Tortosa, et al., 2006). Regulamento (CEE) nº

2568/91 e respetivas alterações estabelecem os limites para a composição esterólica dos azeites, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4 - Limites da composição esterólica em azeites.

Composição esterólica	Concentração
<i>Colesterol</i>	$\leq 0,5\%$
<i>Brassicasterol</i>	$\leq 0,1\%$
<i>Campesterol</i>	$\leq 4,0\%$
<i>Estigmasterol</i> *	$< 4,0\%$
<i>β-sitosterol</i> ^(a)	$\geq 93,0\%$
<i>-7-stigmasterol</i>	$\leq 0,5\%$
<i>Esteróis totais</i>	$\geq 1000\text{mg/kg}$

Fonte: Ramírez-Tortosa, et al., 2006.

Fosfolípidos

Fosfolípido é o termo genérico que se refere a qualquer lípido que contenha um grupo fosfato. Estão identificados como tendo atividade antioxidante. O ácido oleico é o ácido gordo predominante na estrutura dos fosfolípidos, e o seu padrão de ácidos gordos é similar à dos triglicéridos (Sánchez, et al., 2001). A fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina estão identificadas como sendo os principais fosfolípidos encontrados no azeite (Alter & Gutfinger, 1982). Mais recentemente, o ácido fosfatídico e o fosfatidilglicerol, foram identificados e quantificados por cromatografia líquida – espectroscopia de massa (GCMS) (Boukhchina, et al., 2004).

Capítulo 2. Reações de Degradação do Azeite

2.1. Oxidação

2.1.1. Fatores de deterioração do azeite

A oxidação lipídica é um dos principais meios de deterioração dos alimentos, e por isso, um desafio para a indústria e cientistas da área alimentar (Shahidi, 2005). Esta oxidação envolve reações de interação entre ácidos gordos insaturados e espécies reativas de oxigénio que leva a alterações na aparência, textura, tempo de vida útil, características nutricionais e organoléticas dos alimentos (Paraskevopoulou et al., 2007; Shahidi, 2005). Os lípidos são suscetíveis à oxidação quando na presença de (Shahidi, 2005; Villalta, 1999):

- **Luz** - Favorece a reação do azeite com o oxigénio;
- **Temperatura** – Temperaturas elevadas (superiores a 20°C) favorecem a formação de peróxidos e posterior decomposição em aldeídos e cetonas;
- **Oxigénio** - O contato do azeite com o oxigénio é uma das causas de oxidação do mesmo. Quanto mais tempo o azeite estiver em contato com o oxigénio maior será o processo de degradação. Processos como, agitação, trasfegas ou o próprio enchimento do depósito influenciam a oxidação do azeite;
- **Metais** - Os metais produzem um efeito catalisador da auto-oxidação e rancificação do azeite, podendo até conceder um sabor metálico ao azeite;
- **Enzimas** - Os peróxidos são os produtos primários da oxidação do azeite. Os óleos e gorduras como o azeite sofrem um processo de oxidação quando sujeitos à presença de oxigénio, levando à formação de produtos com um sabor e odor desagradável que pode por em causa as propriedades nutricionais e sensoriais do azeite. Quando estas reações ocorrem, ácidos gordos essenciais são destruídos (ácido linoléico e linolênico), bem como algumas vitaminas lipossolúveis. Os ácidos gordos podem ser oxidados por um dos seguintes mecanismos (Kiritsakis, 1992; Shahidi, 2005; Laguerre, et al., 2007).

2.1.2. Fatores Externos que Influenciam a Oxidação

A temperatura, a luz e a concentração de oxigénio são os fatores externos com maior influência na oxidação do azeite (Gouveia, 1995).

O efeito da fotossensibilização é exercido através de compostos minoritários do azeite, tais como pigmentos que podem ser eletronicamente excitados pela absorção de luz e transferência do excesso de energia para a molécula do oxigénio, criando o estado de singuleto favorável à adição de oxigénio a ácidos gordos (Gouveia, 1995).

Com temperaturas elevadas a concentração do oxigénio aumenta. A concentração de radicais alcóxido aumenta, em relação à dos radicais peróxidos inicialmente formados e formando-se, também, compostos poliméricos a partir dos radicais alquilo e alcóxido. Com temperaturas baixas ou moderadas, a velocidade de oxidação é baixa. Os hidroperóxidos são os compostos formados em maior quantidade e a sua concentração aumenta até às etapas avançadas da oxidação, quando se decompõem em compostos voláteis minoritários, em particular, em compostos carbonilo que podem modificar o aroma do azeite (Gouveia, 1995).

A influência dos raios luminosos não é isolada, mas só afeta a qualidade na presença de oxigénio.

O efeito sobre os alimentos é inversamente proporcional ao comprimento de onda da radiação: quanto maior é o comprimento de onda, menor é a energia; por isso, os comprimentos de onda mais prejudiciais situam-se entre 290 e 380nm, zona no espectro do ultravioleta (Gouveia, 1995).

A fonte de radiação U.V., pode ser natural (luz do sol) ou artificial (lâmpada fluorescente).

As reações de foto-oxidação são iniciadas sem um período de indução e continuam aceleradas, deixando um cheiro muito característico e intenso.

Os óleos alimentares tanto de origem animal como vegetal, foto-oxidam, descoram e rancificam como resultado da exposição aos raios ultravioleta.

Portanto, a luz é um catalisador da oxidação tão poderoso como o calor.

A maneira mais segura para reduzir ao mínimo a ação dos raios luminosos sobre os alimentos sensíveis ao oxigénio, consiste em utilizar um ou vários dos seguintes processos:

- Recorrer a embalagens opacas
- Reduzir a quantidade de luz incidente
- Diminuir o teor de oxigénio no interior da embalagem
- Recorrer a materiais impermeáveis ao oxigénio

Vemos assim, que a embalagem não é um objeto luxuoso que apenas serve para “embrulhar” e deitar fora. Tem acima de tudo a função primeira que é a proteção do alimento. Isto só se consegue alcançar-se, à partida, se conhecer a interdependência das sensibilidades dos produtos alimentares às diferentes condições ambientais e as propriedades do material a utilizar (Gouveia, 1995).

2.1.3. Auto-Oxidação

Considerada como sendo a oxidação a baixa temperatura de compostos orgânicos pelo O_2 , envolvendo uma reação radicalar em cadeia. Este tipo de oxidação inicia-se com a formação de hidroperóxidos que sofrem, frequentemente, outras reações. A auto-oxidação pode ser iniciada por resíduos de iões metálicos assim como pela luz ou por iniciadores de radicais comuns. Em certas condições o próprio hidroperóxido sofre uma rutura, dando origem a radicais $RO\cdot$ + $\cdot OH$ que podem atuar como iniciadores e a auto-oxidação torna-se autocatalítica. (Baer, 2006)

Gouveia, (2005) escreve o seguinte sobre a auto-oxidação: quando a auto-oxidação de uma gordura é seguida experimentalmente, isto é, medindo a quantidade de oxigénio consumida, verifica-se que na oxidação se definem duas fases distintas. Na primeira fase, a oxidação desenvolve-se lentamente e a uma velocidade uniforme. É o período de indução. Depois, quando a oxidação atinge um determinado valor, a reação entra na segunda fase, muito rápida e a uma velocidade superior à da fase inicial.

A absorção de oxigénio exige a intervenção de radicais livres, o que explica o período de indução da oxidação, até que a concentração daqueles radicais atinja um certo nível. (Gouveia, 1995).

De acordo com o mesmo autor, as reações de iniciação que se desenvolvem, então, têm uma energia de ativação elevada (35 a 65 kcal/mole), o que explica que sejam facilitadas pelas temperaturas elevadas e sobretudo pela luz e por vestígios de metais, como sejam os que fazem parte da constituição das clorofilas.

Quando a oxidação está mais avançada e o teor de peróxidos é superior, a iniciação, dita secundária, resulta essencialmente da decomposição dos peróxidos; esta decomposição pode ser mono ou biomolecular, segundo a concentração em peróxidos. As energias de ativação das reações são elevadas, mas podem baixar por efeitos da luz e de catalisadores metálicos (20 kcal/mole). No caso da decomposição biomolecular, supõe-se que intervenha um dímero de peróxido, desenvolvendo-se a reação com uma energia de ativação de cerca de 25 kcal/mole. (Gouveia, 1995)

A baixa velocidade das reações de iniciação constitui muitas vezes o fator limitante da oxidação dos lípidos. A velocidade de oxidação é proporcional à raiz quadrada da concentração em peróxidos. Isto significa que, na prática, pode estabelecer-se uma correlação entre a duração da conservação de um óleo e o teor inicial deste em peróxidos. A maior parte dos processamentos tecnológicos favorece a formação de teores relativamente elevados de peróxidos, pelo que a iniciação secundária é favorecida e a oxidação arranca a grande velocidade (Gouveia, 1995)

O mesmo autor continua afirmando que, as reações de propagação são, em geral, rápidas, porque os radicais livres, portadores de um eletrão não emparelhado, são muito reativos.

A propagação traduz-se por uma oxidação em peróxidos dos lípidos não saturados, em simultâneo com consumo de oxigénio gasoso. Os peróxidos acumulam-se, a princípio, mas o seu teor acaba geralmente por baixar. Se o oxigénio não faltar, a totalidade dos lípidos não saturados pode ser oxidada. (Gouveia, 1995)

O aumento do teor de peróxidos durante a propagação, deste que atinja um certo nível, favorece a iniciação. Por outro lado, o número elevado de radicais livres explica a aceleração e o consumo de oxigénio que se observa no fim do período dito molecular. Por isso se diz auto-oxidação, fenómeno em que os peróxidos desempenham o papel de catalisadores. (Gouveia, 1995)

Em média, tendo em conta as reações de iniciação e conclusão, cada radical livre provoca a formação de 10 a 100 moléculas de peróxidos. (Gouveia, 1995)

Segundo, Gouveia (1995), podem ocorrer em simultâneo com as reações de iniciação e propagação, também se podem dar reações de finalização, que conduzem ao desaparecimento de radicais livres e à formação de compostos muito diversos.

2.1.4. Foto-Oxidação

O mecanismo de foto-oxidação envolve a ação direta de oxigénio singulete “oxigénio ativado” aos ácidos gordos insaturados. O oxigénio singulete reage diretamente com as duplas ligações, dando origem aos hidroperóxidos. A forma mais importante de geração de oxigénio singulete é a exposição à luz na presença de um fotosensibilizador, como é o caso da clorofila. (Baer, 2006)

O processo caracteriza-se pela produção de hidroperóxidos, diferentes daqueles obtidos via auto-oxidação, a partir de ácidos gordos insaturados, sem formação de radicais livres na fase inicial (inexistência da fase de indução), ou seja, por um mecanismo diferente do apresentado pela auto-oxidação. Neste caso, o oxigénio tripleto (pouco reativo) é convertido em presença de um fotocatalisador (pigmentos – hemoglobina, riboflavina, clorofila, mioglobina) ou de metais de transição em oxigénio singulete e este reage diretamente na dupla ligação, originando peróxido.

Os peróxidos formados também são degradados em radicais peróxido e estes, uma vez formados, poderão agora propagar a reação com formação de novos radicais R^\bullet e reagir com o abundante 3O_2 (oxigénio tripleto) continuando a reação em cadeia. (Gonzalez, P., Mauriz, et al, 2002)

Os pigmentos clorofilinos existentes no azeite e responsáveis pela sua cor esverdeada são constituídos essencialmente pelas clorofilas alfa e beta e pelos seus produtos de degradação, as feofitinas alfa e beta. Estes pigmentos são compostos fotosensibilizadores que, na presença da luz, produzem oxigénio no estado singulete ($^1\text{O}_2$). Este oxigénio excitado, é muito reativo e reage cerca de 1500 vezes mais rapidamente com o ácido linoleico do que com o oxigénio atmosférico (3O_2). (Baer, 2006)

Os produtos da foto-oxidação dos ácidos gordos insaturados do azeite virgem, são também hidroperóxidos instáveis suscetíveis de se comporem e formarem compostos voláteis, de baixo peso molecular e odor muito penetrante, que provocam o aparecimento do ranço no azeite virgem. (Baer, 2006)

Ao contrário das reações radicais de auto-oxidação que unicamente produzem isómeros hidroperóxidos conjugados, a foto-oxidação, induzida pelos pigmentos clorofilinos, produz tanto isómeros hidroperóxidos conjugados como isómeros hidroperóxidos não conjugados. Num azeite virgem, com baixo conteúdo em ácido linolénico, a presença de uma quantidade substancial do isómero 12-hidroperóxido indica uma foto-oxidação sensibilizada. (Baer, 2006)

2.1.5. Oxidação enzimática

A oxidação lipídica pode ocorrer por catálise enzimática, nomeadamente pela ação das enzimas lipoxigenase. Esta enzima atua sobre os ácidos gordos polinsaturados (ácido linoleico e linolénico e seus esteres), catalisando a adição de oxigénio à cadeia hidrocarbonada polinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem envolver-se em diferentes reações degradativas semelhantes às observadas para os processos de autooxidação originando diversos produtos. O processo catálise enzimática decorre com maior especificidade, em termos de substrato e de produtos finais do que o processo de autooxidação. (Gonzalez, P.,Mauriz, et al,2002).

Um aspeto importante da atuação da lipoxigenase, é o que se relaciona com a sua capacidade para co-oxidar substratos (carotenoides, tocoferois, clorofilas, proteínas)

sendo responsável pela iniciação de novos processos oxidativos. (Gonzalez, P.,Mauriz,et al,2002).

A formação de pequenas quantidades de hidroperóxidos tem um efeito acelerador da oxidação no azeite, uma vez que os radicais formados a partir da decomposição dos hidroperóxidos promovem a continuação da oxidação, causando a formação de “flavours” desagradáveis e a diminuição da estabilidade do azeite durante o armazenamento. (Baer, 2006)

2.1.6. Acção dos antioxidantes

Por definição, antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável. O papel dos antioxidantes é proteger as células do organismo contra a ação oxidante dos radicais livres, os antioxidantes podem atuar de várias maneiras:

- a) Atuam sobre a formação de $^1\text{O}_2$ ou reagem com este;
- b) Ligam-se aos radicais livres, impedindo a continuação da reação;
- c) Decompõem os hidroperóxidos;
- d) Complexam os metais.

A atividade antioxidante do azeite virgem é atribuída principalmente a moléculas de estrutura fenólica como:

- Agliconas da *oleuropeína* e *ligstroside* e os seus compostos relativamente hidrolisados (tirosol e hidroxitirosol);
- Tocoferóis;
- Flavonoides.

Os principais antioxidantes do azeite virgem são os carotenos e compostos fenólicos, incluindo fenóis lipofílicos e hidrofílico. Enquanto os fenóis lipofílicos, entre os quais se incluem os tocoferóis, podem ser encontrados em outros óleos vegetais, alguns fenóis

hidrofílicos do azeite virgem não estão geralmente presentes em outros óleos e gorduras. (Baer, 2006)

Os compostos clorofilinos são os principais pró-oxidantes do azeite virgem. No entanto, em determinadas condições podem funcionar como antioxidantes. Já os tocoferóis, mais concretamente o α -tocoferol, sendo um importante antioxidante, transforma-se em pró-oxidante quando está presente em concentração superior a 1000ppm. (Baer, 2006)

Embora já não tão importantes encontram-se no azeite virgem, outros compostos que manifestam a atividade pró ou antioxidante. Segundo Gouveia (1995), os fosfolípidos fazem baixar a velocidade de oxidação prolongando o período de indução devido a:

- Presença de derivados fenólicos com a atividade antioxígena;
- Efeito sequestrante dos metais;
- Regeneração dos antioxígenos fenólicos;
- Desativação dos radicais livres, produzidos pelo ácido fosfórico;
- Atividade catalítica sobre a decomposição dos hidroperóxidos ou da sua transformação em peróxidos polímeros, quase inativos. (Baer, 2006).

2.2. Hidrólise

Do ponto de vista químico, qualquer gordura é composta por triglicéridos, ou seja, ésteres de ácidos gordos e glicerina. A proporção de triglicéridos no azeite é superior a 98%, sendo o resto componentes minoritários, denominados no seu conjunto como matéria insaponificável. Para avaliar os processos hidrolíticos, que dão como resultado ácidos gordos livres e glicerina, temos como determinação fundamental a percentagem de acidez, que não é mais que a percentagem de ácidos gordos livres presentes no azeite (Baer, 2006).

Capítulo 3. Azeites Aromatizados

3.1. Definição de Azeites Aromatizados

O azeite virgem tem sido, ao longo dos séculos, amplamente utilizado na cozinha mediterrânica, sendo apreciado pelas suas características organoléticas e nutricionais, reconhecidamente comprovadas (Moldão-Martins et al., 2004). Os azeites aromatizados podem ser considerados uma simples moda, mas são uma prática antiga nascida no mediterrâneo com a finalidade de evitar, ou mesmo disfarçar, problemas de reações de degradação oxidativa. A aromatização do azeite com plantas, especiarias ou ervas aromáticas pretende melhorar o valor nutricional, modificar as características sensoriais e, por vezes, aumentar o tempo de prateleira (Antoun & Tsimidou, 1997). Os azeites resultantes adquirem desta forma o sabor correspondente do aromatizante, e são usados para confeção de pratos de culinária e saladas (Gambacorta, et al., 2007).

Os consumidores do Norte da Europa, EUA e Canadá têm introduzido lentamente o azeite virgem na sua dieta, com o intuito de prevenir doenças cardiovasculares. Estes consumidores não estando familiarizados com as características organoléticas dos azeites, estão dispostos a consumir azeites aromatizados como forma de melhorar o flavor do mesmo. Pelas razões anteriores, por ser versátil, e existirem uma vasta gama de sabores, o azeite aromatizado tornou-se num molho popular utilizado por consumidores tradicionais e não tradicionais de todo o mundo (Antoun & Tsimidou, 1997).

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI), o azeite aromatizado é encarado como sendo um tempero, desta forma os azeites aromatizados podem ser chamados de, por exemplo, “Tempero à base de azeite virgem extra aromatizado com especiarias ou ervas”. No entanto na prática, apesar de não poderem ser chamados desta forma, o que dizem os rótulos é “Azeite... aromatizado com...”. (Baiano, et al., 2010).

Assim, por definição, os azeites aromatizados não são considerados Virgem Extra.

3.2. Propriedades dos Aromatizantes

A adição de especiarias ao azeite tem sido utilizada ao longo dos séculos, e os azeites aromatizados são usados para realçar diferentes tipos de pratos culinários. A adição de especiarias ao azeite para além de melhorar as suas propriedades sensoriais e nutricionais tem impacto sobre o prolongamento do tempo de prateleira do azeite (Baiano, et al., 2010). O azeite virgem extra é provido de substâncias com efeitos sadios: ácidos gordos insaturados (ácido oleico), antioxidantes naturais como clorofilas, carotenóides, α -tocoferol e compostos fenólicos. Aos compostos extraídos de plantas aromáticas geralmente são atribuídas interessantes propriedades antioxidantes. Como consequência, a adição de especiarias ao azeite melhora as suas propriedades nutricionais e efeitos benéficos ao nível da saúde, particularmente em termos de prevenção de oxidação. O oxigénio reativo e o azoto são continuamente produzido no corpo humano. Estes são controlados por enzimas endógenas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase) e no caso de uma falha nos mecanismos de defesa ou à exposição a substâncias oxidantes externas, podem ocorrer danos ao nível das biomoléculas (DNA, lípidos, proteínas). Estes danos estão associados a um maior risco de cancro, doenças cardiovasculares, entre outras doenças crónicas. Assim, a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes podem prevenir o risco associado a estas doenças (Stanner, et al., 2004). De todos os antioxidantes, os polifenóis ostentam uma vasta gama de efeitos biológicos (antibacteriano, anti-inflamatório, antialérgico, hepatoprotetor, antitrombótico, ação antiviral, anticancerígeno e vasodilatador) atribuídos genericamente à atividade antioxidante (Middleton, et al., 2000). Para além das propriedades nutricionais benéficas à saúde, a aromatização do azeite poderá ter impacto sobre o tempo de prateleira do produto. Desta forma, os antioxidantes têm sido amplamente utilizados em óleos e gorduras, a fim de impedir a sua oxidação e a consequente produção de sabores indesejáveis, uma vez que a oxidação lipídica pode diminuir o valor nutricional dos alimentos e tem efeitos indesejáveis sobre o nosso organismo. O problema é peculiarmente valorizado na indústria com vista a aumentar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Desta forma, existe um interesse crescente nas especiarias como fonte de antioxidantes naturais (Costa, H. (2012).

3.3. Ervas e Especiarias Utilizadas em Azeites Aromatizados

O termo 'erva' é utilizado como um subconjunto de especiarias e refere-se a plantas com folhas aromáticas.

As especiarias são usadas para preservação, dar sabor, cor e aroma a alimentos ou bebidas. As especiarias provêm de várias partes da planta: casca, botões, flores, frutos, folhas, rizomas, raízes, sementes, estigmas e estilete ou parte aérea das plantas inteiras.

É possível encontrar uma gama muito ampla de azeites aromatizados. Segundo Baiano et al., 2010, os azeites podem ser aromatizados com:

- **Vegetais** (alho, cebola, pimenta-malagueta, pimentão, tomate seco);
- **Ervas** (alecrim, orégãos, manjerição, sálvia, tomilho, zimbro, estragão);
- **Especiarias** (cravo da índia, noz-moscada, gengibre, pimenta-preta, louro);
- **Cogumelos** (trufas);
- **Frutos** (limão, laranja, tangerina, maçã, banana);
- **Frutos secos** (amêndoa, avelã, pinhão);
- **Aromas** (por exemplo, baunilha).

Existem ainda no mercado azeites com outros agentes aromatizantes a título de exemplo referem-se os azeites aromatizados com algas.

Neste ensaio foram utilizados cogumelos *Boletus edulis* (desidratados), trufa Negra (*Tuber melanosporum*) e ouro comestível (E175 aditivo alimentar). De seguida far-se-á uma breve referência.

3.4. *Boletus edulis*

O *Boletus edulis*, conhecido por "Cepe de Bordéus" atinge com facilidade os 25 cm de altura com um chapéu hemisférico espesso e largo de cor castanha assente sob um pé grosso de cor branca com estrias acastanhadas apenas junto ao chapéu. Aparece sob o coberto dos soutos muito associado à sua folhagem em decomposição e nos terrenos de giestas a Norte do distrito de Viseu. (Martins, M. 1999).

- **Chapéu** em certos casos alcançam grandes dimensões, até 30 cm de diâmetro. De cor muito variável, predominando o castanho, com a margem mais clara. Muito carnudo e mostrando-se ligeiramente viscoso em tempo de chuvas, depois seco. A sua forma vai desde hemisférica a convexa, aplanando-se na velhice.
- **Tubos** brancos quando é jovem mas se tornam amarelos com o tempo e finalmente verdes, são separáveis com facilidade do chapéu e não chegam aos pés (livres).
- **Poros** com cores e imutáveis tanto ao tacto como ao corte.
- **Carne** branca e imutável ao contacto com o ar, duro quando é um exemplar jovem e vai tornando-se mais esponjoso com a idade. De odor fúngico agradável e sabor a avelã.
- **Habitat:** Uma espécie adaptada a múltiplos habitats. Encontra-se junto de pinheiros, carvalhos, faias, abetos e até mesmo silvas.



Figura 8 - Cogumelo (*Boletus edulis*).

Fonte: Fungipedia.

Tabela 5 - Valor Nutricional dos *Boletus edulis* (por 100g).

➤ <i>Calorias</i>	25 kcal.
➤ <i>Proteínas</i>	1,7 g.
➤ <i>Hidratos de carbono</i>	3,7 g.
➤ <i>Gorduras totais</i>	0,4 g.
➤ <i>FIBRA</i>	2 g.
<u><i>Vitaminas</i></u>	<u><i>Minerais</i></u>
<i>Vitamina C</i>	8 mg.
	<i>Potássio</i> 190 mg.
	<i>Cálcio</i> 25 mg.
	<i>Magnésio</i> 6 mg.
	<i>Ferro</i> 1,3 mg.

Fonte: natursan,2017.

Desde a antiguidade que os cogumelos, especialmente os silvestres, têm vindo a ocupar um papel primordial na alimentação humana. Este facto deriva essencialmente das propriedades nutricionais como se pode observar na tabela 5, organolépticas e farmacológicas que apresentam. São alimentos de alto valor nutritivo, possuindo elevado teor em proteínas, vitaminas, minerais e compostos aromáticos; e baixo teor em hidratos de carbono e lípidos. Caracterizam-se ainda por possuírem elevada actividade antioxidante e antimicrobiana, podendo ser utilizados para baixar o colesterol, inibir o desenvolvimento de tumores e funcionar como imunomoduladores. Estas características fazem com que os cogumelos apresentem um elevado valor económico nos mercados internacionais (Martins, M. 1999).

3.5. *Tuber melanosporum*

As espécies com maior valorização económica são as silvestres micorrízicas. De entre elas destacam-se a trufa negra de Périgord (*Tuber melanosporum*) figura 9, com preços na ordem dos 500 a 1.750 €/kg e a famosa trufa branca italiana (*Tuber magnatum* Pico & Vitt.) cujos preços de venda podem variar entre 1500 e 17.500 €/kg, existindo mais variedades de trufas no mercado tabela 6. Os cogumelos de cultura, apesar de

apresentarem cotações inferiores, são igualmente um recurso de crescente valorização e procura pelo mercado, pelo facto de se encontrarem disponíveis todo o ano. (Baptista, P. 2010).

A trufa é um fungo subterrâneo muito apreciado pelo sabor e aroma característicos. São consideradas uma iguaria desde a época romana e consumidas em várias partes do mundo. Assim como os outros fungos, a trufa é rica em água contendo cerca de 80% a 90% de sua composição. Possui também proteínas, hidratos de carbono e baixo teor calórico, como se pode observar na tabela 7, o que faz da trufa um alimento nutritivo e saudável. Desenvolvem-se a uma profundidade de 20 a 40 centímetros abaixo da terra e estabelecem uma relação de simbiose com as raízes de árvores como o carvalho e a castanheira. A trufa, por ser incapaz de realizar a fotossíntese, captura nutrientes das raízes de árvore. Já as árvores extraem os sais minerais vindos das trufas. Por isso é uma relação de simbiose, pois há benefícios em ambas as espécies (Baptista, P. 2010).

A trufa é formada por duas partes sendo a primeira o fruto (comestível) e a segunda formada pelas raízes do fungo chamadas Micelium, responsável por sua produção. As trufas adquirem tamanhos variados, podem ser pequenas, grandes, circulares ou irregulares. Fatores como temperatura, umidade, grande quantidade de água e composição do terreno são fundamentais para o desenvolvimento deste fungo. Cada variedade exige um clima específico (Baptista, P. (2010).

Tabela 6 - As Várias Variedades de Trufas

Variedades de Trufas	
<i>Tuber Melanosporum Vittadini</i> Trufa negra de inverno Trufa de Périgord Trufa de Norcia	São as mais conhecidas e atingem o tamanho de uma laranja. São apreciadas principalmente na culinária francesa. A colheita ocorre entre novembro e março. As melhores trufas negras estão em Espanha, Itália, França, Portugal, Hungria, Grécia e Alemanha. Também são encontradas na Nova Zelândia e Óregon (EUA).
<i>Tuber Magnatum Pico</i> Trufa Branca	As mais caras por serem difíceis de encontrar. Possuem tamanhos variados. As trufas brancas são conhecidas pelo excelente aroma.
<i>Tuber Aestivum Vittadini</i> Trufa de Verão	São as trufas mais facilmente encontradas. Ocorrem entre junho e setembro e estão em quase toda a Europa.
<i>Tuber Uncinatum Chatin</i> Trufa de Borgonha	Semelhante á trufa Aestivum, porém os meses de colheita são de setembro a dezembro.
<i>Tuber Albidum Pico</i> <i>Tuber Borchii Vittadini</i> Trufa da Toscana Trufa Bianchetto	A colheita destas trufas é feita de janeiro a abril, em toda a Europa. Geralmente são pequenas de aroma forte, cores variáveis dependendo do local onde amadurecem.
<i>Tuber Brumale Vittadini</i> Trufa Negra Brumale Trufa de Inverno	É uma pequena trufa caracterizada pelo aroma intenso.
<i>Tuber Excavatum Vittadini</i> ("Trufa Mágica"), <i>Tuber Rufum Pico</i> ("Trufa Vermelha")	Trufas não comestíveis.

Fonte: (W. Siegfried, Composition des aliments et tables de nutrition, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 4. Réimpression. Stuttgart, 1989).



Figura 9 - Trufa Negra (*Tuber melanosporum*) utilizada no ensaio.

Fonte: Jacinto Mestre.

Tabela 7 - Valores Nutricionais da Tufa Negra para 100 g de (*Tuber melanosporum*).

Nutriente	Conteúdo	Minerais	Conteúdo
Calorias	105 Kj	Sódio	77 mg
Água	75,5 g	Potássio	526 mg
Proteína	5,53 g	Magnésio	23,8 mg
Lipídico	0,51 g	Cálcio	24 mg
Hidrato de carbono	0,00 g	Ferro	3,5 mg
Fibra	16,54 g	Fósforo	62 mg
Minerais	1,92 g	Cloreto	27,7 mg

Fonte: W. Siegfried, Composition des aliments et tables de nutrition, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 4. Réimpression. Stuttgart, 1989.

3.6. Ouro Comestível (E175 aditivo alimentar de luxo)

Os mais antigos registros sobre o uso medicinal do ouro vêm da Alexandria, Egito. Há 5.000 anos, os egípcios ingeriam ouro para a purificação da mente, corpo e espírito. Os antigos acreditavam que o ouro, no corpo, trabalhava para a estimulação da vida e aumentava o nível de vibração em todos os níveis. Aproximadamente há 4.500 anos, os egípcios já usavam ouro em odontologia. Arqueólogos modernos têm encontrado notáveis exemplos dos antigos usos do ouro. Hoje, ainda a favor do ouro como material

ideal para o trabalho dentário, aproximadamente 13 toneladas desse metal são usadas, a cada ano, para a confecção de coroas, pontes, restaurações e dentaduras. O ouro é ideal para tais aplicações porque é não-tóxico, pode ser facilmente modelado e nunca se desgasta, corrói ou perde o brilho.

Os Alquimistas de Alexandria desenvolveram um "elixir", feito de ouro líquido. Acreditavam ser o ouro um metal místico que representou a perfeição da matéria, e que sua presença no corpo poderia estimular, rejuvenescer, além de curar uma série de doenças, bem como restaurar a juventude e a saúde perfeita (Silver Colloids, 2017).

Na Roma antiga, pomadas (ungüentos) feitas com ouro eram usadas para o tratamento de úlceras na pele, e, hoje em dia, finas folhas de ouro têm também papel importante no tratamento de úlceras crônicas (Silver Colloids, 2017).

O uso do ouro em pó para combater dores causadas pela artrite foi passado através dos séculos e, ainda hoje, é usado no tratamento da artrite reumatóide, tendo sua eficácia confirmada por pesquisas da medicina moderna. Nos anos 1900, cirurgiões implantavam peças de ouro de US\$ 5 dólares sob a pele próxima a uma junta inflamada, tal como joelho ou cotovelo. Como resultado, a dor, com frequência, diminuía ou cessava (Silver Colloids, 2017).

Na China, as propriedades reconstituintes do ouro são ainda reconhecidas nas cidades do campo, onde camponeses cozinham o arroz colocando na panela uma moeda de ouro, a fim de ajudar a reabastecer o ouro em seus corpos, e alguns restaurantes chineses utilizam folhas de ouro de 24 quilates em suas preparações (Silver Colloids, 2017).



Figura 10 - Ouro Comestível (E175 aditivo alimentar de luxo).

Fonte: Ouro Gourmet Portugal.

Hoje em dia, os usos do ouro em medicina têm se expandido grandemente. Malhas feitas com finíssimos fios de ouro são usadas em cirurgia para corrigir ("remendar") vasos sanguíneos, nervos, ossos e membranas. Médicos modernos injetam partículas de ouro microscópicas para ajudar a retardar o cancro de próstata no homem; mulheres com cancro no ovário são tratadas com soluções de ouro. Lasers de vapor de ouro são utilizados para encontrar e destruir células cancerosas, sem causar danos às células vizinhas (Silver Colloids, 2017).

Diariamente, cirurgiões fazem uso de instrumentos de ouro para "iluminar" artérias coronárias e, lasers recobertos com ouro, dão nova vida a pacientes com problemas no coração, e que não podem passar por uma cirurgia (Silver Colloids, 2017).

Um novo composto experimental de ouro bloqueia a replicação do vírus em células infectadas e está a ser testado para o tratamento da sida (Silver Colloids, 2017).

Alguns pesquisadores estão colocando ouro no DNA para estudar material genético híbrido em células. Outros o estão usando para determinar como as células respondem às toxinas, calor e stress físico. Por ser ele biologicamente benigno, bioquímicos usam-no para produzir compostos com proteínas, criando novas drogas "salvavidas". O ouro tem

sido conhecido através dos anos por seu efeito direto sobre as atividades do coração, auxiliando na circulação sanguínea. Beneficia o rejuvenescimento lento dos órgãos, especialmente o cérebro e o sistema digestivo e tem sido usado nos casos de congestão glandular e nervosa e nas falhas de coordenação (Silver Colloids, 2017).

De acordo com numerosos estudos, o ouro coloidal aumenta a acuidade mental e a habilidade de concentração. Trabalhos recentes apontam um aumento de 20% no Q.I. de pessoas que ingerem diariamente doses de ouro coloidal, por apenas três semanas O ouro coloidal tem sido pensado para fortalecer o funcionamento mental, pelo aumento da condutividade entre terminais nervosos no corpo e sobre a superfície do cérebro (Silver Colloids, 2017).

O ouro comestível (ouro comestível, folha de ouro ou flocos) é geralmente usado em chocolates, sobremesas, bebidas, etc.. Na indústria alimentar, ouro comestível é conhecido como o E175 aditivo e não é considerado de forma alguma como parte das necessidades nutricionais dos seres humanos. Não é prejudicial para quando ingerimos uma vez que é biologicamente inerte (Silver Colloids, 2017).

3.7. Desenvolvimento de novos produtos

Durante as últimas décadas a sociedade viu-se com transformações nas suas condições económicas, demográficas e socioculturais, bem como o crescimento de segmentos populacionais e variação dos hábitos alimentares, que levou a que atualmente os consumidores prefiram alimentos diferenciados, sendo essa compra motivada por fatores económicos, atitudes, preferências ou percepções (Samir, 2002). Os produtos com gordura têm sido uma fonte de interesse no desenvolvimento, processamento e controlo de qualidade por parte das empresas (O'Brian, 2009). No que diz respeito ao azeite, as indústrias têm vindo a apostar no desenvolvimento de azeites com ervas aromáticas de forma a aumentar o valor nutricional do produto e acompanhar ao mesmo tempo as tendências e desenvolvimento de novos produtos alimentares (Baiano et al., 2010).

O âmbito deste trabalho passa pela inovação, tentando criar produtos à base de azeite de maior valor acrescentado.

As duas principais empresas a operar neste mercado, no qual as marcas próprias desempenham igualmente um papel importante ao atingirem uma quota em volume de 22,7%, têm-se destacado pela forma como conseguiram inovar neste mercado, em virtude da necessidade de alterar toda uma lógica à qual o consumidor estava condicionado (Aragão, 2005).

A inovação, depois de anos a fio de estagnação, tem finalmente marcado o sector. Oliveira da Serra que acaba de lançar Oliveira da Serra Sabores, a nova gama de azeites virgem extra, indicados para consumidores modernos que gostam de inovar e apreciar novos sabores (Aragão, 2005). Compreendendo o significado da evolução do azeite na cozinha e a apetência dos consumidores por novas experiências, este é o desafio lançado pela marca, ao aliar o azeite a sabores distintos (Aragão, 2005).

Segundo o mesmo autor, outro exemplo de inovação é a marca Gallo. A Gallo apostou na imagem, criando uma nova embalagem e ainda no lançamento de novos produtos. Lançou no mercado o Gallo Primeiro Azeite, extraído a frio, com uma acidez bastante reduzida e de sabor suave e delicado. Lançou ainda no mercado nacional outros produtos: o Azeite Gallo Colheita ao Luar (levemente picante), o Azeite Gallo Novo (comercializado no Brasil), o Azeite Gallo Colheita Tardia Delicado, o Azeite com Ervas Aromáticas – Estragão, Orégãos e Tomilho, a Pasta de Azeitona Gallo (azeitonas verdes ou pretas) Ainda na área alimentar, segundo Rodrigues, 2009 e em terras da Beira Alta, uma empresa do Fundão, lançou o Azeite com Ouro (pepitas) (Gallo, 2017).

A empresa Diterro, tem-se dedicado à Manteiga de Azeite, que não é mais do que o azeite congelado, pronto a barrar. Esta empresa também comercializa azeite com a marca Almojanda, que muito recentemente lançou a Azeite Almojanda Com Malagueta (inteira dentro do frasco) (Jorge, 2009).

Capítulo 4. Parte Experimental

A indústria alimentar é uma área que se encontra em constante desenvolvimento, que combina a inovação tecnológica com a inovação cultural e social (Earle, 1997).

A procura dos consumidores por produtos gourmet pode aumentar a utilização e procura por azeites não tradicionais (por exemplo com adição de Trufas e *Boletus edulis*), ao mesmo tempo que aumenta o valor deste produto alimentar.

4.1. Objetivos

Face à necessidade do sector oleícola em inovar e na perspectiva de aromatizar azeite, foi proposto na Cooperativa Agrícola de Beja e Brinches, C.A.B.B, fazer um estudo com Azeite Virgem Extra macerado com Trufas Negras (*Tuber melanosporum*), *Boletus edulis* e adição de partículas de ouro comestíveis, contribuindo de igual forma com os seus múltiplos efeitos benéficos, os objectivos deste trabalho passam por o desenvolvimento de novos produtos, a partir da criação de azeites virgens extra aromatizados. Assim, serão testadas duas percentagens de produto (4% e 8%) e dois períodos de maceração (45 e 90 dias). Na segunda fase do ensaio serão adicionadas partículas de ouro comestível às amostras de azeite seleccionadas e será testada a sua resistência oxidativa, através da exposição contínua à luz artificial, por um período de 30 dias, para avaliar a influência deste elemento metálico no tempo de prateleira destes produtos quando expostos nas superfícies comerciais.



Figura 11 - Processo de maceração no laboratório de vinho e azeite do IPBeja.

Fonte: Jacinto Mestre.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Amostragem

No presente trabalho foi utilizado um lote de azeite virgem extra produzido pela Cooperativa de Agrícola de Beja e Brinches, (CABB). Os aromatizantes (Trufas Negras, *Boletus Edulis* e Ouro comestível) foram introduzidos individualmente em garrações de 5l, nas proporções consideradas para este trabalho, 4% e 8% de trufas e *Boletus*, e o tempo de maceração foi de 45 e 90 dias. Posteriormente e passado este tempo de maceração o azeite aromatizado passou para garrafas de 100ml com a adição de 5 mg de ouro comestível. Nove destas garrafas foram armazenadas num local escuro e 16 foram expostas á luz artificial 24H por dia durante um período de 30 dias antes de se proceder ás análises (ver figura 12). No final dos 30 dias as amostras foram divididas, tendo metade sido enviada para o LET (Laboratório de Estudos Técnicos) do ISA (Instituto superior de Agronomia de Lisboa) para realização de algumas análises: Estabilidade Oxidativa pelo método (Rancimat), Absorvância no ultra violeta e Polifenóis Totais e, a outra metade da

amostra ficou no laboratório de vinhos e azeites do IPBeja para realização das análises: índice de acidez, índice de peróxidos, pigmentos clorofilinos e carotenoides e a cor (L^* , a^* , b^*). Para cada um dos agentes aromatizantes, e para o controlo (sem qualquer agente) foram preparadas, no total, 25 amostras (25 garrafas).

Antes da realização das análises, as amostras foram filtradas com papel de filtro, por forma a remover possíveis impurezas e humidade que pudessem estar presente. Cada uma das determinações foi efetuada em triplicado de acordo com o procedimento analítico em questão.

Tabela 8 – Codificação das amostras.

AMOSTRA	REF ^a
T4/45-C/OURO-LUZ	T4-4GL
T8/45-C/OURO-LUZ	T8-4GL
T4/45-S/OURO-LUZ	T4-4L
T8/45-S/OURO-LUZ	T8-4L
B4/45-C/OURO-LUZ	B4-4GL
B8/45-C/OURO-LUZ	B8-4GL
B4/45-S/OURO-LUZ	B4-4L
B8/45-S/OURO-LUZ	B8-4L
T4/90-C/OURO-LUZ	T4-9GL
T8/90-C/OURO-LUZ	T8-9GL
T4/90-S/OURO-LUZ	T4-9L
T8/90-S/OURO-LUZ	T8-9L
B4/90-C/OURO-LUZ	B4-9GL
B8/90-C/OURO-LUZ	B8-9GL
B4/90-S/OURO-LUZ	B4-9L
B8/90-S/OURO-LUZ	B8-9L
T4/45-S/LUZ (ESCURO)	T4-4
T8/45-S/LUZ (ESCURO)	T8-4
B4/45-S/LUZ (ESCURO)	B4-4
B8/45-S/LUZ (ESCURO)	B8-4
T4/90-S/LUZ (ESCURO)	T4-9
T8/90-S/LUZ (ESCURO)	T8-9
B4/90-S/LUZ (ESCURO)	B4-9
B8/90-S/LUZ (ESCURO)	B8-9
CONTROLO	C

Trufa Negra; Boletus Edulis ; control

Legenda: T = Trufa; B = Boletos; 4/8% = Percentagem de trufas/Boletos; 45/90 = Dias de maceração; C/luz; S/Luz; C/Ouro; S/Ouro; C= Controlo.

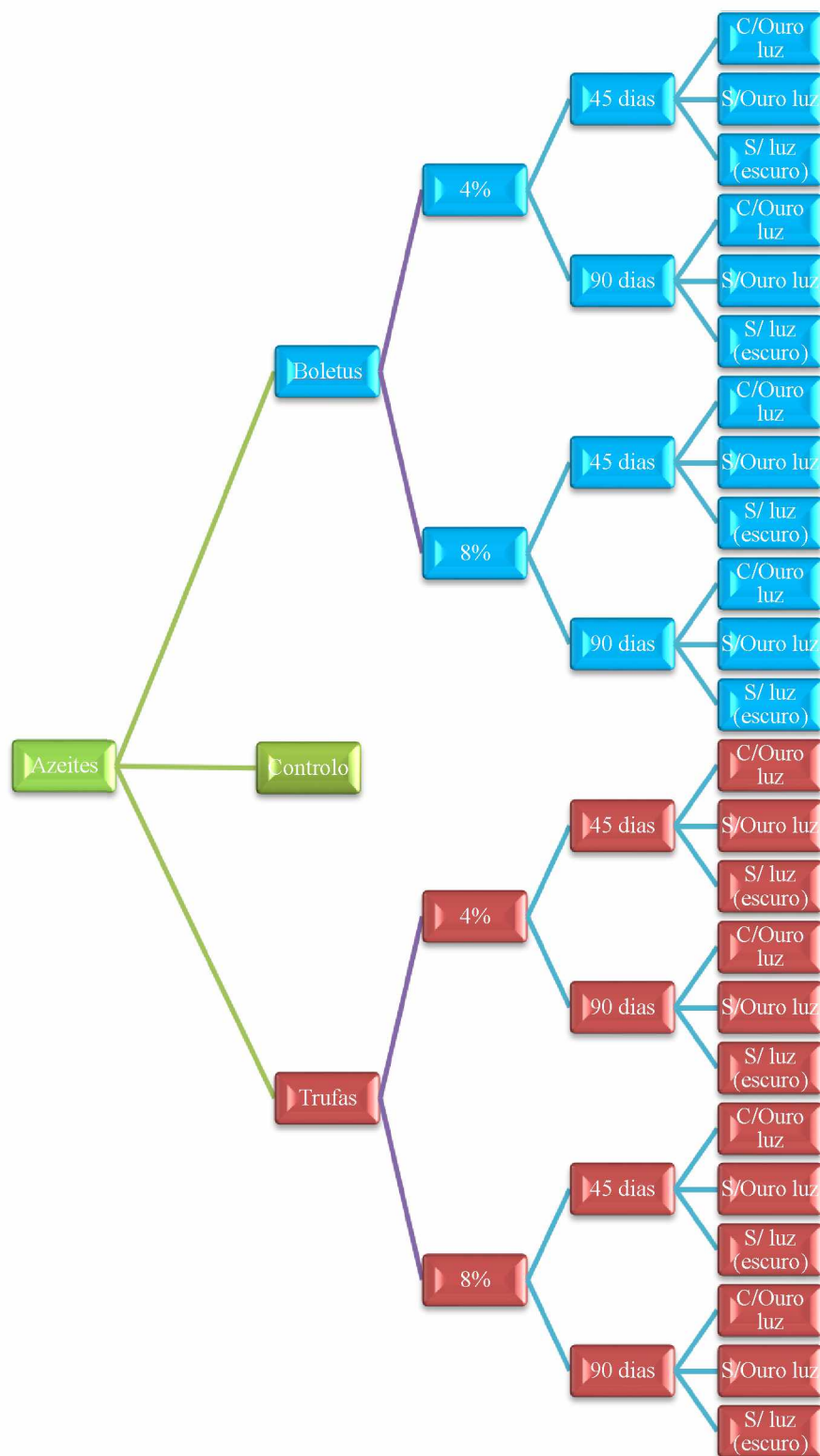


Figura 12 – Esquematização do delineamento experimental.

Legenda: T = Trufa; B = Boletos; 4/8% = Percentagem de trufas/Boletos; 45/90 = Dias de maceração; C/luz; S/Luz; C/Ouro; S/Ouro; C= Controlo.

4.2.2. Percentagem de acidez

A acidez de um azeite é consequência da rutura dos triacilgliceróis, devido a uma reação de hidrólise, com libertação de ácidos gordos. Existem fatores que levam a um aumento da acidez do azeite, como por exemplo a infestação do fruto por insetos (moscas), atrasos na colheita do fruto e extração, frutos doentes devido a fungos, contacto prolongado entre água e azeite após extração e métodos de extração defeituosos (Kiritsakis, 1998). A medição da percentagem de acidez é feita desta forma pela avaliação dos ácidos gordos livres, expressa em grama de ácido oleico por 100 grama de óleo, e apresenta como limite legal 2%, para azeite virgem, a partir do qual deixa de estar apto para consumo e tem de ser refinado (Granados, 2000).

A determinação da acidez foi executada de acordo com o anexo II do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações, com a seguinte metodologia: a toma de amostra para cada ensaio foi de, aproximadamente, 5,0 g, independentemente da acidez presumida; num matraz, a solução (1:1) etanol/éter etílico e as tomas de azeite foram tituladas com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína, até aparecimento de cor rosada ténue e persistente. A acidez mede a percentagem de ácidos gordos que estão libertados da estrutura dos triacilgliceróis (expressa em % de ácido oleico) e, como refere Peres (1995), esta informação tem importância no processo de auto-oxidação, já que os ácidos gordos livres oxidam-se mais facilmente do que estando esterificados no glicerol.

A determinação foi efetuada de acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91.

De acordo com o Regulamento de execução (UE) nº 299/2013 da comissão que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 o limite legal é de $\leq 2\%$ para azeite virgem e de $\leq 8\%$ para azeite virgem extra.

4.2.3. Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos (IP) é frequentemente utilizado como indicador da qualidade de um azeite virgem, visto que está relacionado com a formação dos hidroperóxidos compostos iniciais e é medido em termos de miliequivalentes de oxigénio ativo por Kg de gordura (Gunstone, 2002). Os hidroperóxidos são os primeiros produtos resultantes da oxidação das gorduras formando-se, pelo menos durante as etapas iniciais, a um ritmo paralelo à quantidade de oxigénio absorvido. O limite legal para este parâmetro é de 20 meq O₂/Kg de azeite para azeites virgem extra segundo o Regulamento (CE) N.º 2568/91 e suas alterações. A determinação do índice de peróxido está de acordo com o anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. No entanto, como refere Gouveia (1995), os hidroperóxidos são compostos muito instáveis que, por decomposição, dão origem a produtos carbonílicos, com moléculas pequenas, que modificam o “flavour” das gorduras, mas não são mensuráveis por este índice. Portanto, o índice de peróxidos, só constitui uma medida útil do grau de oxidação no início da reação.

De acordo com o Regulamento de execução (UE) nº 299/2013 da comissão que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 o limite legal para o índice de peróxidos é de ≤ 20 mEq O₂/kg para azeite virgem e virgem extra.

4.2.4. Absorvância no ultra violeta

A análise de azeite por espectrofotometria no ultravioleta fornece indicações sobre a sua qualidade uma vez que deteta compostos oxidados anormais (Granados, 2000). A absorvância é medida a vários comprimentos de onda, a partir dos quais é possível determinar-se os coeficientes específicos. Os valores dos coeficientes específicos K₂₆₈ (268 nm), K₂₃₂ (232 nm) e ΔK são utilizados para avaliar a autenticidade e a qualidade do azeite virgem, quando estes valores são baixos estamos perante azeites de boa qualidade (Kiritsakis, 1992; Bouskou, 1998). Os hidroperóxidos conjugados absorvem a 232 nm, os produtos da oxidação secundária (aldeídos e cetonas), absorvem a comprimentos de onda de 262, 268, 270 e 274 nm. De acordo com A determinação foi efetuada de acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91.

De acordo com o Regulamento de execução (UE) nº 299/2013 da comissão que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 os azeites virgem extra apresentam limites de 2,5 para K232, 0,22 para K268 e 0,01 para ΔK . A análise da absorvância no ultravioleta foi efetuada segundo o anexo IX do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991.

4.2.5. Cor

O azeite virgem é um produto natural, cuja cor depende apenas dos compostos biológicos presentes, como por ex. os pigmentos clorofilinos e carotenoides (Boskou, 1998). A presença de vários pigmentos depende de fatores como o modo de cultivo do fruto, o solo ou as condições climáticas e o processo de extração (Minguez Mosquera et al., 1991). O grau de maturação da azeitona é outro fator que influencia a cor do azeite. Azeitonas verdes dão origem a um óleo verde devido ao alto conteúdo em clorofila. Azeitonas maduras dão origem a um azeite amarelo devido ao conteúdo em carotenoides e diminuição mais acentuada dos pigmentos clorofilino. A combinação exata e as proporções de pigmentos determinam a cor final do azeite que pode variar desde um amarelo ouro até a um verde escuro (Kiritsakis, 1998). A determinação da cor será efetuada com o auxílio do equipamento (colorímetro), LICO 620, aplicando os valores fornecidos com a escala C.I.E.: L (luminosidade), a^* e b^* (cromaticidade). O termo a^* pode variar entre a cor verde (-a) e vermelha (+a), o b^* pode variar entre azul (-b) e amarelo (+b) e o L pode variar de 0 (escuro) a 100 (claro).

4.2.6. Compostos fenólicos totais

Compostos fenólicos ou polifenóis são compostos naturais de origem vegetal e são sintetizados pelas plantas como metabolitos secundários, usualmente como mecanismo de defesa contra patogénicos (Barberán, 2003).

Estes compostos têm a capacidade de participar em diversas reações metabólicas celulares de oxidação-redução, regular a atividade de diferentes enzimas e distintos processos celulares e possuem atividade antioxidante, protegendo os ácidos gordos insaturados da degradação oxidativa, sendo também benéficos em termos nutricionais e de saúde. (Salguero, D. G. 2014).

Para a determinação dos polifenóis totais utilizou-se o procedimento interno do Laboratório de vinho e azeite da escola Superior Agrária de Beja, que se baseia na leitura espectrofotométrica das absorvências a 725 nm após reação com solução de Folin-Ciocalteu.

O procedimento foi o seguinte:

➤ **Preparação da solução referencia:**

Para um balão de 25 ml mediu-se 14 ml de água destilada, 2,50 ml de mistura metano/água (6/4) e 1,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteu.

Agitou-se e guardou-se no escuro durante 3 minutos. Ao fim deste tempo, adiciona-se 4 ml de Na_2CO_3 a 20% e completou-se com água destilada.

➤ **Técnica:**

Pesou-se, rigorosamente, cerca de 10 g de azeite (com 3 casa decimais) e dissolveu-se em 25 ml de n-hexano 99 % pa. Transferiu-se para uma ampola de 100 ml. De seguida fizeram-se três extrações de 10 ml cada com a mistura de metanol/água (6/4), recolhendo os três extratos para dentro de um balão de 50 ml. Completou-se com água destilada, obtendo-se assim o extrato fenólico.

Para um balão de 25 ml, mediu-se 14 ml de água destilada, 5 ml de extrato fenólico (medido com pipeta diferencial) e 1,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se, energeticamente, e guardou-se no escuro durante 3 minutos. Após este tempo, junta-se 4 ml da solução de Na_2CO_3 a 20%, completou-se com água e colocou-se ao abrigo da luz durante uma hora. Este procedimento foi feito em triplicado para cada amostra.

Ao fim deste tempo fez-se a leitura no espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/ VIS Lâmpada 40), a 725 nm usando uma célula de quartzo de 1 cm. Na célula de referência usou-se a solução indicada no ponto a).

➤ Expressão dos resultados:

A quantificação dos polifenóis totais foi feita através da fórmula:

$$(8,540 \times \text{leitura} - 0,248) \times 10 \times 25$$

Peso da amostra

Os resultados vêm expressos em mg/kg com uma casa decimal

Não existem limites legais para o teor de Polifenóis totais.

4.2.7. Pigmentos clorofilinos e carotenóides

As características cromáticas do azeite virgem e a cor, constituem parâmetros sensoriais importantes. As tonalidades esverdeadas estão associadas a maiores teores em clorofilas e as tonalidades alaranjadas aos carotenóides. Clorofilas e carotenóides tendem a decrescer progressivamente ao longo da maturação dando lugar às antocianinas (Minguéz-Mosquera, 1991). As clorofilas e carotenóides apresentam um papel importante no processo oxidativo do azeite. A clorofila funciona como antioxidante na ausência de luz e como pró-oxidante na presença de luz (Guiffrida et al, 2011 citado por Maia, 2014). O método utilizado para a determinação dos pigmentos é o método interno do Laboratório de Vinhos e Azeites da Escola Superior Agrária de Beja, adaptado de Minguéz-Mosquera, M (1991). Sendo efetuado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 670nm e 470nm. Procedimento:

Pesar 7,5g azeite, dissolver em ciclohexano para um balão de 25ml até perfazer. Agitar e ler os valores das absorvências a 670nm e 470nm.

Expressão de resultados:

$$\text{Clorofilas (mg/kg)} = (A_{670} \times 106) / (613 \times 100 \times d)$$

$$\text{Carotenoides (mg/kg)} = (A_{470} \times 106) / (2000 \times 100 \times d)$$

Os resultados vêm expressos em mg de luteína/ kg azeite

Não existem limites legais para os Pigmentos clorofilinos e carotenóides

4.2.8. Estabilidade oxidativa (Rancimat)

O Rancimat é um método para a medição da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras em condições aceleradas, com base na indução de oxidação da amostra por exposição a temperaturas elevadas e o fluxo de ar. O Rancimat baseia-se no registo das variações da condutividade da água destilada na qual se faz a recolha de ácidos de baixo peso molecular (maioritariamente ácidos fórmico e acético) resultantes da oxidação dos óleos e gorduras em condições de oxidação acelerada (Damiechki et al. (2001).

A estabilidade à oxidação foi avaliada pelo método de condutividade (Rancimat 743, Methrom Ltd., Suíça). É um processo que consiste em fazer borbulhar uma corrente de ar, filtrada, limpa e seca (20 L/h) através de uma toma de amostra (3,0 g) aquecida a $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. Os compostos de oxidação formados ao longo do tempo, mais polares que os triglicéridos, tais como hidroperóxidos, álcoois e compostos carbonílicos, são arrastados pelo fluxo de ar e borbulham posteriormente numa solução aquosa. Nesta solução está imerso um elétrodo que mede a sua condutividade. O aparelho efetua as análises automaticamente e em contínuo, só podendo interromper-se a operação quando, para cada amostra, a condutividade medida atinge o seu máximo ($300\mu\text{S}/\text{cm}$). O cálculo dos tempos de estabilidade oxidativa das amostras é feito pelo programa informático, associado ao aparelho, pelo traçado das tangentes à curva obtida. O intervalo de tempo compreendido entre o início do registo e o ponto de interceção das tangentes à curva, corresponde ao chamado “período de indução” (Costa, H. (2012).

Esta análise foi efetuada no LET (Laboratório de Estudos Técnicos) do Instituto Superior de agronomia de acordo com metodologia interna.

4.3. Análise estatística

4.3.1. Análise descritiva e análise de variância

Para avaliar a qualidade dos resultados obtidos para cada um dos parâmetros foi usada a estatística descritiva, através da determinação da média, desvio e erro padrão, bem como intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. E para monitorizar a evolução da

degradação do azeite virgem aromatizado no decorrer do ensaio, foram efetuadas análises de variância a um fator (teste de Scheffé para comparação de médias).

A análise de variância dos parâmetros avaliados foi analisada pelo software estatística 10.0 (StatSoft Enterprise). Os efeitos da adição de aromatizantes ao azeite sobre os parâmetros de qualidade (acidez, índice de peróxido, K₂₃₂, K₂₆₈), teor em compostos fenólicos, estabilidade oxidativa, foram o principal fator estudado.

4.3.2. Tratamento estatístico dos resultados

Todos os tratamentos e gráficos foram elaborados pelos “software” Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, 2013) e estatística 10.0 (StatSoft Enterprise). Os valores médios foram obtidos a partir de 3 réplicas laboratoriais das várias amostras do ensaio. Assim, cada valor médio está associado a, pelo menos, três repetições (n = 3). Para além das médias dos atributos foram determinados os desvios padrão, para incluir nas tabelas de resultados.

A comparação entre os valores médios obtidos nas amostras das diferentes gorduras, para um determinado parâmetro, foi feita através da elaboração de gráficos de barras no Microsoft Excel 2013.

4.4. Resultados e Discussão

No presente capítulo apresentam-se os resultados das análises após tratamento estatístico e faz-se a sua discussão recorrendo a uma tabela (tabela 9) onde estão o valor médio, o desvio padrão e a análise de variância dos resultados obtidos para todas as amostras e todas as determinações e ainda a gráficos de barras com cores, para melhor visualização das diferenças entre amostras.

Apesar dos resultados demonstrarem a qualidade do azeite virgem testado, é de realçar o facto de se estarem a ensaiar azeites aromatizados, figura 13 que, de acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI), não poderem ser classificados como azeite virgem ou azeite virgem extra mas sim serem denominados de “tempero à base de azeite virgem extra aromatizado com especiarias”. Uma vez que ainda não se encontram, na bibliografia, muitos artigos ou teses sobre o tema dos azeites aromatizados com *Tuber melanosporum* ou *Boletus edulis*, nem com adição de partículas de ouro, houve a necessidade de utilizar estudos realizados com aromatizantes diferentes como base de comparação de resultados.



Figura 13 - Ensaios dos azeites macerados com Trufas, Boletus e adição de ouro.

Fonte: Jacinto Mestre.

Tabela 9 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Azeite Macerado, referentes as análises químicas.

AMOSTRA	Ac	IP	CRT	CLF	K232	K268	EA	PT	L*	a*	b*
T4-4GL	0,52(0,01) ^{cde}	9,82(0,09) ^{bcd}	0,05(0,02) ^c	0,37(0,02) ^a	1,58(0,01) ^{defg}	0,10(0,00) ^{ab}	13,90(0,10) ^{cde}	190,87(1,27) ^a	90,53(1,11) ^a	-8,71(0,40) ^{ab}	103,87(0,85) ^a
T8-4GL	0,55(0,00) ^{abcd}	8,72(0,02) ^{cde}	0,07(0,04) ^c	0,40(0,04) ^a	1,38(0,02) ^h	0,08(0,00) ^f	13,97(0,21) ^{cde}	160,10(1,40) ^{ef}	89,98(0,99) ^a	-8,81(0,30) ^{ab}	104,05(0,23) ^a
T4-4L	0,48(0,05) ^{de}	7,93(0,01) ^{de}	0,05(0,00) ^c	0,37(0,01) ^a	1,58(0,01) ^{defg}	0,08(0,00) ^{ef}	13,87(0,06) ^{cdef}	190,47(2,11) ^a	90,65(0,04) ^a	-9,09(0,12) ^{ab}	104,70(0,66) ^a
T8-4L	0,48(0,00) ^{def}	7,19(0,02) ^e	0,08(0,02) ^c	0,41(0,02) ^a	1,37(0,02) ^h	0,09(0,00) ^{cdef}	14,17(0,15) ^{bcd}	159,57(0,76) ^{ef}	90,44(0,20) ^a	-9,13(0,09) ^{ab}	105,21(0,20) ^a
B4-4GL	0,44(0,00) ^{efgh}	7,62(0,06) ^e	0,06(0,01) ^c	0,39(0,01) ^a	1,55(0,02) ^{efg}	0,09(0,00) ^{bcd}	14,70(0,10) ^{ab}	176,20(1,18) ^b	90,21(0,44) ^a	-8,88(0,41) ^{ab}	104,80(0,67) ^a
B8-4GL	0,38(0,01) ^{fghi}	8,20(8,08) ^{de}	0,08(0,00) ^c	0,35(0,00) ^a	1,55(0,01) ^{efg}	0,09(0,00) ^{cdef}	14,77(0,15) ^{ab}	170,40(1,01) ^{bc}	90,08(0,38) ^a	-8,59(0,30) ^a	104,42(0,28) ^a
B4-4L	0,34(0,00) ^{ij}	7,49(3,09) ^e	0,07(0,01) ^c	0,40(0,02) ^a	1,56(0,01) ^{defg}	0,10(0,00) ^a	14,90(0,10) ^a	175,03(1,72) ^{bc}	90,29(0,16) ^a	-8,97(0,16) ^{ab}	104,84(0,22) ^a
B8-4L	0,46(0,06) ^{defg}	7,39(2,00) ^e	0,05(0,01) ^c	0,39(0,01) ^a	1,57(0,02) ^{defg}	0,10(0,00) ^{ab}	14,53(0,15) ^{abc}	173,33(0,45) ^{bc}	90,38(0,21) ^a	-8,97(0,31) ^{ab}	104,05(0,33) ^a
T4-9GL	0,58(0,01) ^{abc}	8,36(3,00) ^{de}	0,06(0,03) ^c	0,37(0,02) ^a	1,69(0,02) ^a	0,09(0,00) ^{abcde}	13,13(0,12) ^{ghij}	175,10(1,11) ^{bc}	90,07(0,46) ^a	-9,41(0,14) ^{ab}	104,16(0,32) ^a
T8-9GL	0,64(0,03) ^a	7,80(1,05) ^{de}	0,08(0,02) ^c	0,38(0,02) ^a	1,66(0,01) ^{abc}	0,09(0,00) ^{abcde}	13,70(0,10) ^{defghi}	170,33(0,95) ^{bc}	90,12(0,37) ^a	-9,67(0,13) ^{ab}	105,03(0,47) ^a
T4-9L	0,58(0,02) ^{abc}	8,86(5,03) ^{cde}	0,07(0,01) ^c	0,38(0,01) ^a	1,68(0,01) ^{ab}	0,09(0,00) ^{bcd}	13,37(0,15) ^{efghij}	173,53(0,81) ^{bc}	90,36(0,51) ^a	-9,43(0,09) ^{ab}	104,80(0,33) ^a
T8-9L	0,62(0,01) ^{ab}	7,71(2,00) ^{de}	0,08(0,00) ^c	0,39(0,01) ^a	1,61(0,02) ^{cde}	0,10(0,00) ^a	13,13(0,15) ^{ghij}	169,67(0,71) ^{bcd}	89,80(0,62) ^{ab}	-9,51(0,04) ^{ab}	105,42(0,19) ^a
B4-9GL	0,29(0,01) ^{ij}	7,63(2,02) ^e	0,10(0,00) ^{bc}	0,41(0,00) ^a	1,55(0,02) ^{efg}	0,09(0,00) ^{abcde}	13,87(0,06) ^{cdef}	155,27(3,06) ^{efg}	89,04(0,08) ^{abcd}	-9,24(0,16) ^{ab}	104,47(0,36) ^a
B8-9GL	0,35(0,01) ^{hij}	8,45(3,00) ^{de}	0,07(0,02) ^c	0,38(0,02) ^a	1,60(0,01) ^{cdef}	0,09(0,00) ^{abcde}	13,20(0,10) ^{fghij}	139,37(1,95) ^h	89,03(0,27) ^{abcd}	-9,22(0,20) ^{ab}	104,57(0,26) ^a
B4-9L	0,26(0,01) ^j	8,84(3,03) ^{cde}	0,08(0,01) ^c	0,39(0,01) ^a	1,55(0,01) ^{efg}	0,10(0,00) ^{abcd}	13,47(0,15) ^{efghij}	151,53(3,14) ^g	89,19(0,45) ^{abc}	-9,16(0,43) ^{ab}	104,52(0,67) ^a
B8-9L	0,35(0,01) ^{hij}	8,92(5,09) ^{cde}	0,07(0,01) ^c	0,40(0,01) ^a	1,62(0,01) ^{bcd}	0,09(0,00) ^{abcde}	13,07(0,06) ^{ij}	141,53(1,16) ^h	88,42(0,63) ^{abcd}	-9,46(1,09) ^{ab}	103,85(1,16) ^a
T4-4	0,53(0,01) ^{bcd}	8,49(2,01) ^{de}	0,27(0,01) ^a	0,37(0,01) ^a	1,56(0,01) ^{defg}	0,10(0,00) ^{ab}	13,77(0,15) ^{defgh}	189,00(0,72) ^a	87,17(0,32) ^{bcd}	-10,53(0,05) ^b	107,07(1,72) ^a
T8-4	0,60(0,01) ^{abc}	11,71(3,07) ^{ab}	0,29(0,01) ^a	0,40(0,01) ^a	1,42(0,02) ^h	0,09(0,00) ^{abcde}	13,97(0,15) ^{cde}	162,07(1,85) ^{de}	86,52(0,04) ^{cde}	-10,36(0,13) ^{ab}	108,06(1,10) ^a
B4-4	0,30(0,00) ^{ij}	7,45(4,06) ^e	0,30(0,01) ^a	0,42(0,01) ^a	1,56(0,01) ^{defg}	0,09(0,00) ^{abcde}	14,20(0,17) ^{bcd}	175,27(0,95) ^{bc}	86,42(0,16) ^{de}	-10,17(0,37) ^{ab}	108,18(0,94) ^a
B8-4	0,38(0,01) ^{ghi}	8,90(3,04) ^{cde}	0,29(0,01) ^a	0,40(0,01) ^a	1,53(0,01) ^{fg}	0,09(0,00) ^{abcd}	13,80(0,10) ^{defg}	171,60(0,62) ^{bc}	86,61(0,70) ^{cde}	-9,98(0,39) ^{ab}	106,55(1,61) ^a
T4-9	0,59(0,01) ^{abc}	12,52(4,01) ^a	0,27(0,01) ^a	0,37(0,01) ^a	1,70(0,01) ^a	0,10(0,01) ^{abcd}	13,10(0,10) ^{hij}	173,13(1,07) ^{bc}	87,22(0,23) ^{bcd}	-10,47(0,05) ^b	106,27(0,55) ^a
T8-9	0,62(0,01) ^{ab}	10,62(1,03) ^{abc}	0,29(0,01) ^a	0,40(0,01) ^a	1,59(0,01) ^d	0,10(0,00) ^{abcd}	12,97(0,12) ^j	168,40(0,96) ^{cd}	86,49(0,91) ^{de}	-10,43(0,51) ^b	107,03(2,51) ^a
B4-9	0,30(0,01) ^{ij}	11,89(2,00) ^{ab}	0,30(0,01) ^a	0,40(0,01) ^a	1,53(0,02) ^g	0,10(0,00) ^{abc}	14,17(0,06) ^{bcd}	153,63(1,40) ^{fg}	85,46(0,22) ^e	-9,83(0,05) ^{ab}	107,05(0,46) ^a
B8-9	0,35(0,01) ^{hij}	12,25(1,04) ^a	0,31(0,02) ^a	0,43(0,02) ^a	1,56(0,02) ^{defg}	0,10(0,00) ^{abcd}	13,83(0,06) ^{def}	152,67(1,05) ^{fg}	85,48(0,27) ^e	-9,45(0,39) ^{ab}	107,04(0,39) ^a
C	0,27(0,01) ^j	8,92(0,03) ^{cde}	0,17(0,02) ^b	0,37(0,02) ^a	1,53(0,02) ^{fg}	0,09(0,00) ^{def}	14,30(0,20) ^{abcd}	190,77(1,46) ^a	89,94(0,80) ^a	-9,12(0,38) ^{ab}	104,92(0,62) ^a

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas P<0,05, n=3 (teste Scheffé)

Legenda: Percentagem de acidez; Índice de Peróxidos; Índice espectrofotométrico, K232, K268 ;Polifenóis; Rancimat (EA-Estabilidade Oxidativa) ;Cor-L*a*b; Pigmentos Clorofilinos (CLF) e Carotenoide (CRT).

4.4.1. Percentagem de acidez

A acidez de um azeite resulta do grau de desagregação dos triacilgliceróis, devido a reações químicas de hidrólise ou lipólise, formando-se desta forma os ácidos gordos livres. Assim, a acidez não tem qualquer relação com o seu sabor, mas com fatores que incluem ataque de pragas e doenças, contacto prolongado da água com o azeite e ainda métodos de colheita, transporte, armazenamento e extração descuidados. Os valores de acidez dos azeites testados (controlo e aromatizados) encontram-se no intervalo de 0,2 a 0,6%, figura 14. Segundo o Regulamento de Execução (EU) nº 299/2013, da Comissão que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91, podemos verificar que todas as amostras apresentaram um valor de acidez sempre inferior ao estipulado para a categoria de azeite virgem extra, durante o tempo do ensaio. Existem, no entanto diferenças significativas entre os azeites macerados com trufas e os macerados com *Boletus*, tendo os primeiros apresentado sempre valores superiores de acidez. Pensa-se que este resultado se deva ao facto das trufas serem frescas e os *Boletus* desidratados, o que terá favorecido a reação de hidrólise dos triglicéridos do azeite, com libertação dos ácidos gordos livres. Como era de esperar, devido à influência da humidade, as amostras com maior percentagem de aromatizante (8%), apresentaram uma percentagem de acidez superior. Não se verificou influência da adição de partículas de ouro nem da exposição à luz neste parâmetro. O valor de acidez mais elevado foi o da amostra T8-9GL (0,64%) e o mais baixo o da amostra B4-9L (0,26%) e o da amostra controlo (C): 0,27%.

Nos trabalhos de Gambacorta, *et al.*, (2007), em azeites aromatizados com alho desidratado a acidez manteve-se inalterada. Por seu lado Baiano, *et al.*, (2009) concluíram que os azeites aromatizados com alho desidratado, na produção e no armazenamento, apresentaram sempre valores de acidez inferiores aos restantes azeites, incluindo o azeite não aromatizado. Considerando que de acordo com Mariz, *et al.*, (2005), que utilizou alho fresco no seu ensaio, o alho possuía um teor apreciável em água (na ordem dos 63%), sendo de supor que a água existente no alho levou à ocorrência de reações enzimáticas ou de hidrólise, responsáveis pelo aumento da acidez, verificado pelo autor.

Na figura 14 apresentam-se os resultados dos valores médios na forma gráfica.

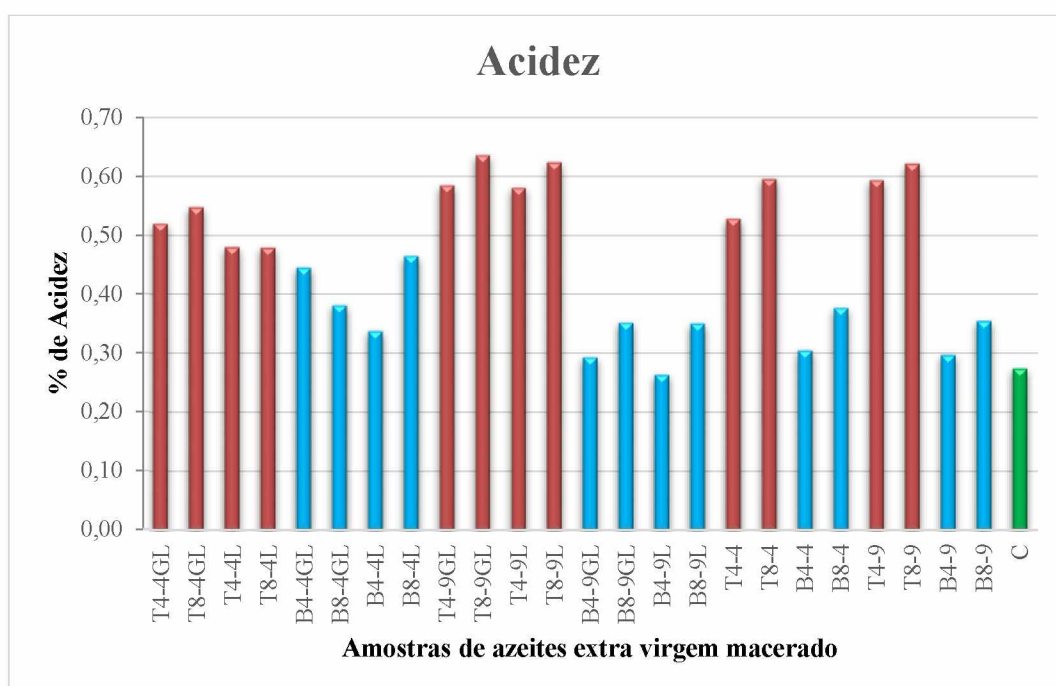


Figura 14 - Valores médios dos resultados das determinações da percentagem de acidez.

4.4.2. Índice de peróxidos

Os peróxidos são os produtos primários da oxidação do azeite extra virgem. Os azeites são oxidados quando entram em contacto com o oxigénio que pode existir no espaço superior do recipiente e nele se dissolve. Os ácidos gordos essenciais tais como ácido linoleico e linolénico são destruídos, e certas vitaminas solúveis são degradadas.

A luz potencia a formação dos peróxidos e consequentemente a aceleração da reação de oxidação. No ensaio, no entanto, verificou-se que as amostras expostas à luz foram as que apresentaram menor formação de peróxidos em relação às que ficaram na ausência de luz. Estes resultados permitem sugerir o papel do ouro como antioxidante, atrasando a formação de compostos primários da oxidação (ver figura 15). Parece haver um efeito positivo do aromatizante no atraso da formação de peróxidos, quando exposto à luz, que não se verifica na ausência de luz. Pode também concluir-se que a adição de partículas de ouro não potenciaram a degradação oxidativa das amostras de azeite durante os 30 dias do ensaio. O índice de peróxidos variou entre os 7,19 para a amostra T8-4L e os 12,52

para a amostra T4-9, muito abaixo do valor máximo legislado para as categorias de azeite virgem e de azeite virgem extra (20 meq. O₂/Kg azeite). A amostra controlo (C) apresentou um valor de 8,92. Estes efeitos antioxidantes, trufa negra e *boletus* ambos com adição de ouro, foram mais expressivos do que os relatados por Antoun & Tsimidou (1997) e Gambacorta, et al. (2007), no entanto Baiano, et al. (2009) nos seus estudos obtiveram para azeites aromatizados com alho valores relativamente baixos de índice de peróxido em comparação com os restantes azeites avaliados.

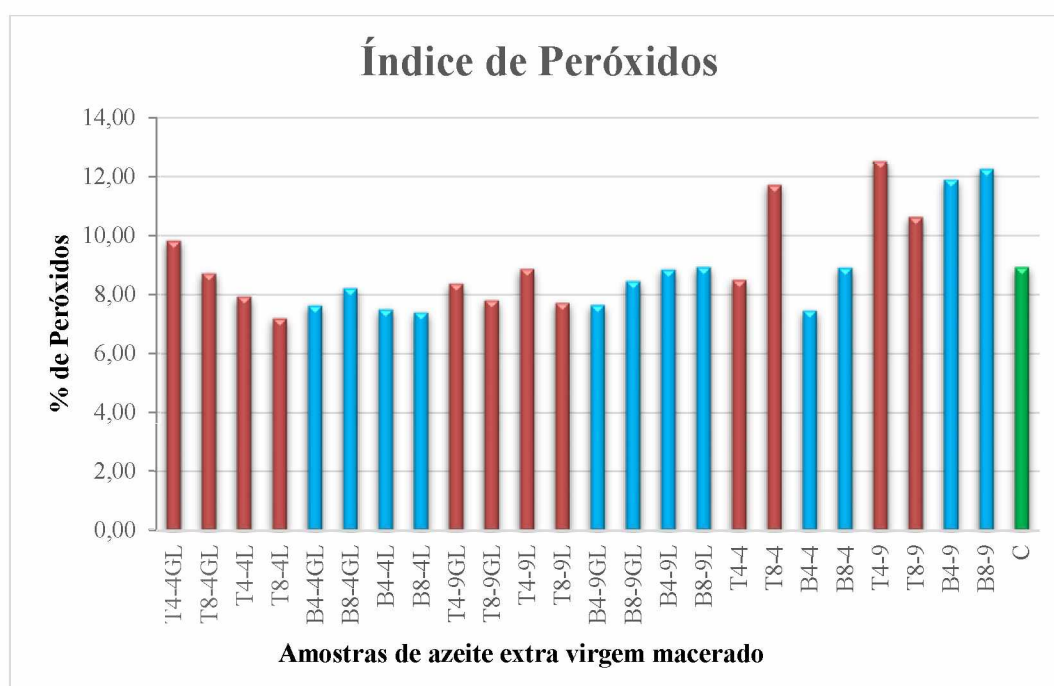


Figura 15 - Valores médios dos resultados da determinação do índice de Peróxidos.

4.4.3. Índices espectrofotométricos (K232 e K268)

A leitura do valor das absorvências em determinados comprimentos de onda na região do ultra-violeta, permite determinar o estado de oxidação das gorduras insaturadas, recorrendo à quantificação de produtos primários e secundários da oxidação.

A comparação dos resultados obtidos para estes índices espectrofotométricos estão representados nos gráficos das figuras 16 e 17.

Na avaliação dos coeficientes de extinção específicos (K₂₃₂ e K₂₆₈), é possível verificar o grau de oxidação do azeite, complementando as observações com o índice de peróxidos. Estes coeficientes são indicativos da conjugação de trienos (K₂₃₂), produtos de oxidação primária e da presença de compostos carbonílicos (K₂₆₈), produtos da oxidação secundária, respetivamente.

Observando a figura 16, pode verificar-se uma ligeira influência da maceração do azeite com a trufa negra, uma vez que as amostras com maior percentagem de trufa (8%) maior tempo de maceração (90 dias) apresentaram uma tendência para um valor de k₂₃₂ inferior às maceradas com 4% do aromatizante e durante 45 dias. O mesmo não se verificou para as amostras maceradas com *Boletus*. Também não se verificou uma influência assinalável da adição de ouro nem da exposição à luz. É também de realçar o facto de este parâmetro não ter sofrido uma evolução considerável durante o ensaio e todas as amostras se mantiveram abaixo do limite legal para azeite virgem extra (2,5). Assim, a amostra que apresentou um valor superior foi a T4-9GL (1,68) e a que apresentou o valor mais baixo foi a T8-4L (1,37), tendo a amostra controlo apresentado o valor de 1,53.

Para o índice k₂₆₈ não houve qualquer variação durante o ensaio, tendo os valores variado entre 0,08 e 0,10, independentemente da variável considerada. O valor máximo permitido para a categoria de azeite virgem extra é de 0,22. Conclui-se que não houve degradação oxidativa das amostras, pelo que a adição do aromatizante, a dição de partículas de ouro e a exposição à luz não afectaram negativamente as amostras neste parâmetro (figura 17).

Do mesmo modo, estudos realizados por Gambacorta, *et al.* (2007) determinaram que os valores de K₂₃₂ e K₂₆₈, nos azeites aromatizados com alho, orégãos e malagueta, não sofriam qualquer alteração em comparação com o azeite de referência (não aromatizado); recentemente, Baiano, *et al.* (2009) concluíram que a adição de especiarias aumentava os valores dos coeficientes de extinção específicos, exceto para o azeite aromatizado com alho que obteve os valores mais baixos de K₂₃₂ e K₂₆₈ (2,11 ± 0,12 e 0,14 ± 0,01, respetivamente).

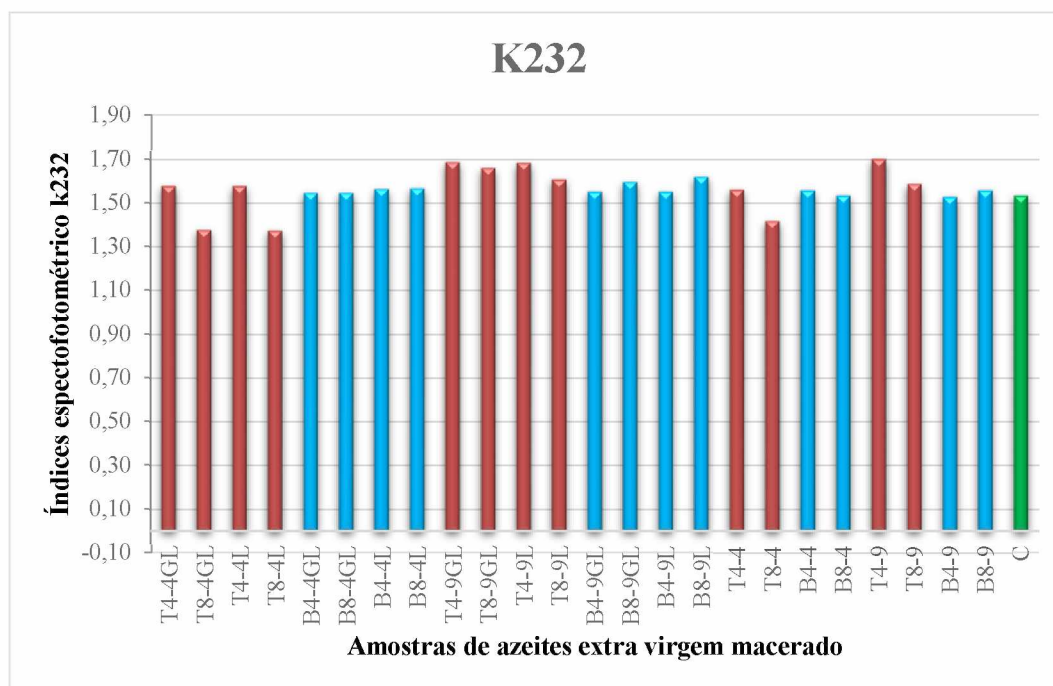


Figura 16 - Valores médios dos resultados das determinações do K232.

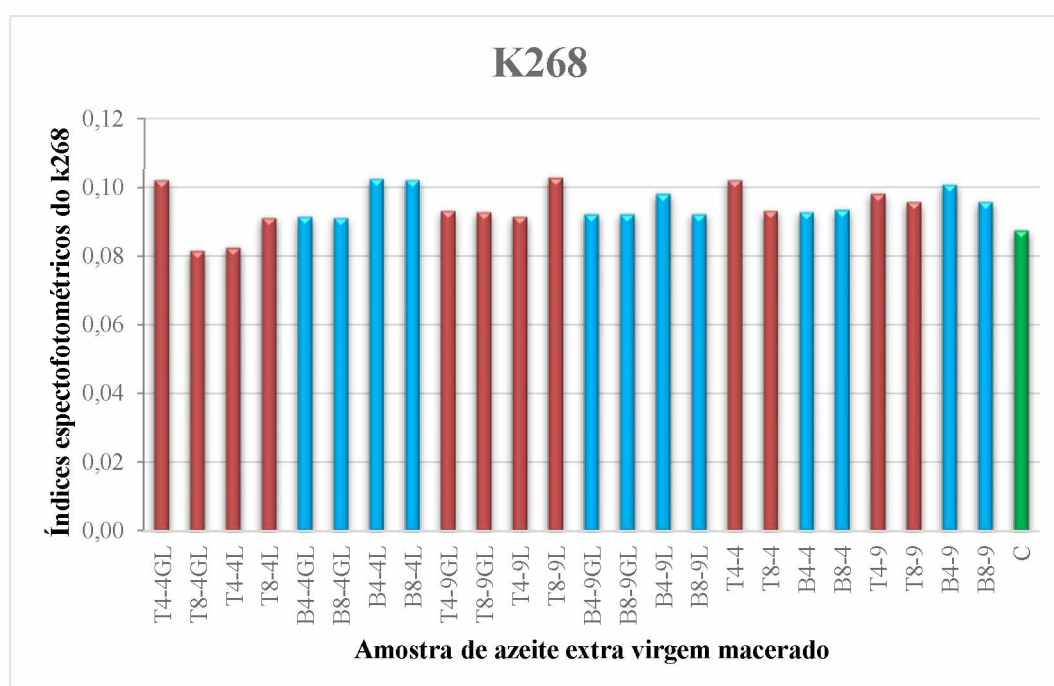


Figura 17 - Valores médios dos resultados das determinações do K268.

4.4.4. Estabilidade oxidativa Rancimat

De um modo geral, e de acordo com a figura 18, as amostras que apresentaram maior estabilidade oxidativa foram as maceradas com os boletos, (principalmente os de menor tempo de maceração e com exposição à luz), quando comparadas com as amostras maceradas com trufas negras, tendo estas, apresentado valores de estabilidade oxidativa sempre inferiores à amostra controlo (C). O valor mais elevado medido pelo Rancimat foi o da amostra B4-4L (14,90 horas) e o menor o da amostra T8-9 (12,97 horas). A amostra controlo apresentou um valor de 14,30 horas. Como se pode observar, apesar da tendência verificada, as diferenças entre amostras não foram muito evidentes.

As amostras que apresentaram menor estabilidade oxidativa foram as aromatizadas com trufas, Figura 18, também maior tempo de maceração (90 dias), independentemente de se encontrarem na presença ou ausência de luz. O ouro não afetou significativamente este parâmetro.

Estes resultados podem indicar alguma influência do aromatizante na estabilidade das amostras sendo, no entanto necessários mais ensaios para comprovar estes resultados.

Em relação a outros autores e, na impossibilidade de se encontrarem resultados de estabilidade oxidativa com azeites macerados com trufas Negras e cogumelos *Boletus edulis*, fez-se uma pesquisa sobre azeites aromatizados no geral e encontrou-se que Damiechki, *et al.* (2001) realizou um ensaio destinado a determinar a influência da presença de antioxidantes e próoxidantes em azeites aromatizados com orégãos e alecrim. Os seus dados confirmam que a estabilidade oxidativa dos azeites aromatizados foi maior do que a do controlo utilizando o teste Rancimat.

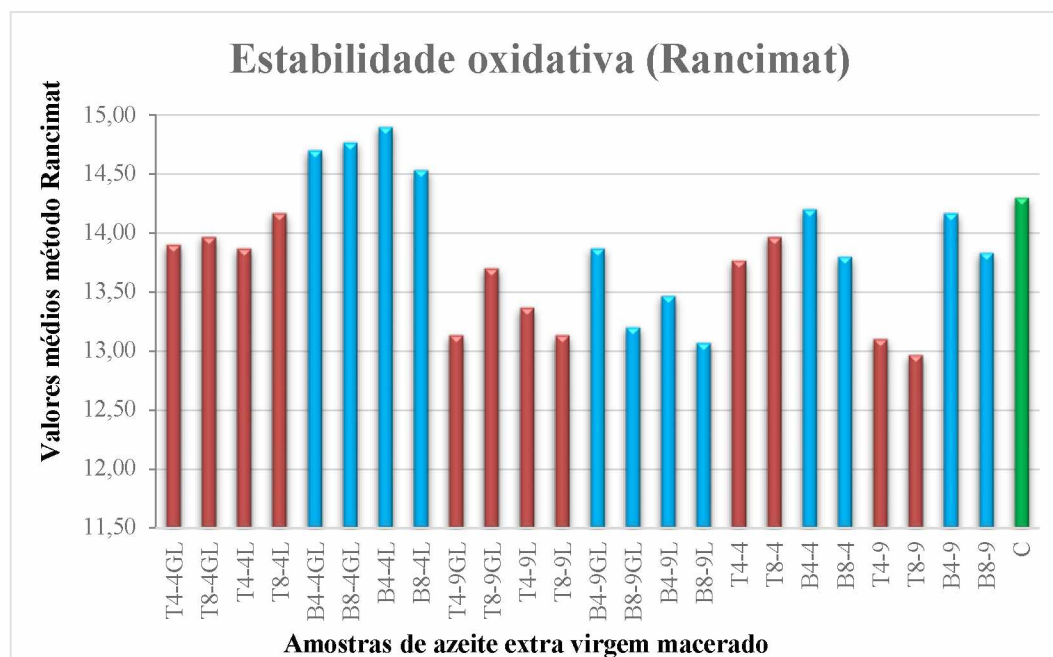


Figura 18 - Valores médios dos resultados das determinações da estabilidade oxidativa (Rancimat).

4.4.5. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais obtidos para as diferentes amostras estão representados na figura 19. A concentração de polifenóis mais elevada foi encontrada na amostra T4-4GL (190,87 mg de ácido cafeico/kg de azeite), e o menor teor apresentou a amostra B8-9GL (139,37 mg/kg). A amostra inicial ou de controlo (C) apresentou um teor de 190,77 mg/Kg. De um modo geral houve uma ligeira diminuição no conteúdo em compostos fenólicos totais para quase todas as amostras analisadas, em relação à amostra controlo, excepto para as amostra T4-4GL, T4-4L e T4-4, que não apresentaram diferenças significativas em relação à amostra inicial ou de controlo. Verifica-se que a adição de ouro e a exposição à luz não afetou a maior ou menor composição em compostos fenólicos das amostras e que os compostos fenólicos potencialmente existentes nos aromatizantes não foram solubilizados para o azeite durante o tempo de maceração.

A adição de aromatizantes induziu, no geral, perdas ao nível dos compostos fenólicos totais de forma significativa ($p < 0,001$).

Estas diferenças entre os fenóis totais de azeites não aromatizados e aromatizados podem ser explicados por interações ocorridas entre o azeite e os agentes aromatizantes, nomeadamente entre os polifenóis e outros compostos das especiarias (Negishi, et al., 2002). A diferença encontrada entre os azeites aromatizados e não aromatizados está de acordo com os obtidos por Baiano, et al., (2009), apesar destes azeites terem sido aromatizados (macerados) de forma diferente. Damiechki, et al. (2001) realizaram um estudo destinado a examinar a presença de antioxidantes e pró-oxidantes em azeites aromatizados com orégãos e alecrim. Eles descobriram que o conteúdo fenólico total nos azeites aromatizados aumentava em comparação com a do controlo.

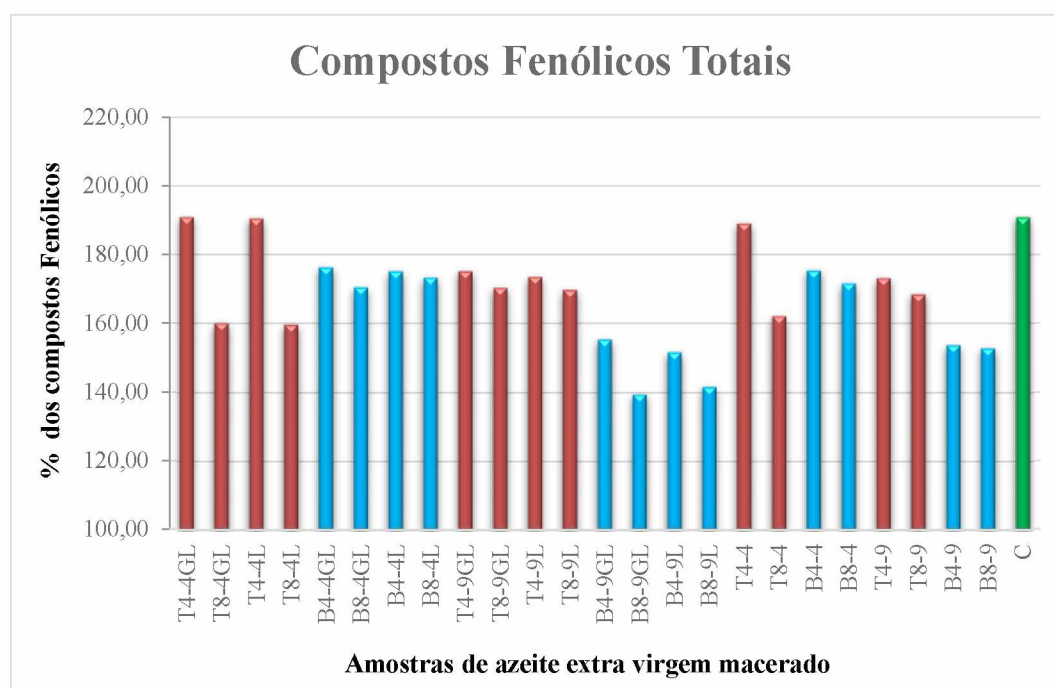


Figura 19 - Valores médios dos resultados das determinações de Polifenóis Totais.

4.4.6. Pigmentos Carotenoides e Clorofilinos

As clorofilas e os carotenoides são um importante aspeto na estabilidade oxidativa devido à sua capacidade antioxidante natural no escuro e atividade pró-oxidativa quando expostos à luz e são os principais responsáveis pela cor dos azeites (Giuffrida, et al., 2007). Os pigmentos clorofilinos estão relacionados com a cor verde do azeite e são muito

afetados pela luz, degradando-se e acabando o azeite por ficar completamente incolor com o tempo, quando exposto à luz. Além disso, na presença de luz, a clorofila apresenta uma ação pró-oxidante podendo favorecer a oxidação do azeite embalado em garrafas incolores.

Os pigmentos, estando relacionados com a cor do azeite, são muito importantes para as características dos azeites, desempenhando papel fundamental na aceitabilidade por parte dos consumidores.

A cor do azeite varia entre verde-amarelo e dourado, dependendo do estado de maturação da matéria-prima, a azeitona. A cor verde é atribuída a clorofila enquanto a cor amarela está relacionada principalmente com o conteúdo de carotenoides.

Os carotenóides são compostos lipossolúveis sensíveis à luz e ao oxigénio. Na ausência destes fatores, os carotenóides são estáveis nos alimentos, mesmo a temperaturas elevadas. A sua degradação é acelerada pelos radicais livres que se formam durante a oxidação lipídica (Silva, 2008).

Estes pigmentos desempenham um papel importante na estabilidade do azeite. As clorofilas comportam-se como antioxidantes no escuro e como agentes pró-oxidantes, quando exposto à luz (Silva, 2008).

No presente ensaio a luz afetou muito significativamente o teor de carotenoides de todas as amostras, independentemente do teor em aromatizante, do tempo de maceração e da adição de ouro.

De acordo com a figura 20, verifica-se que as amostras mantidas na ausência de luz apresentaram um conteúdo em carotenoides superior à amostra inicial C (controlo), também mantida na ausência de luz, o que poderá indicar a solubilização destes compostos presentes nas Trufas e nos *Boletus* para o azeite.

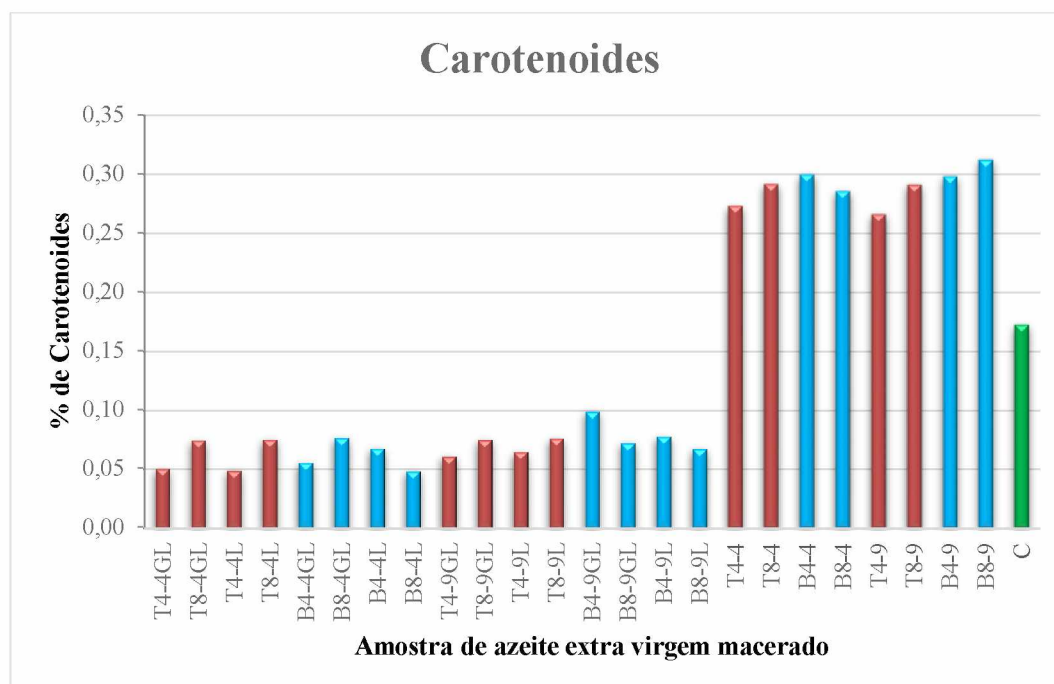


Figura 20 - Valores médios dos resultados das determinações dos Pigmentos carotenóides.

A presença de luz, no entanto, afetou muito negativamente as amostras, tendo o conteúdo em carotenóides praticamente desaparecido das amostras. A amostra que apresentou o conteúdo mais elevado em pigmentos carotenóides foi a amostra B8-9 (0,43 mg/Kg) e a que apresentou o menor conteúdo foram as amostras T4-4GL e T4-4L com 0,05 mg/Kg. Na amostra inicial ou de controlo o teor foi de 0,17 mg/Kg.

Como se pode observar na figura 21 e ao contrário do que seria de esperar, não se verificaram diferenças significativas no conteúdo em compostos clorofilinos, relacionados com o aromatizante, com o ouro ou mesmo com luz. Todos os valores se situaram entre os 0,37 e os 0,43 mg/Kg. Sendo que os pigmentos clorofilinos são normalmente destruídos pela luz, o facto de, no presente ensaio, não se verificar essa destruição, poderá indicar uma influência positiva do aromatizante na protecção da clorofila. Não se verificou influência da adição de partículas de ouro.

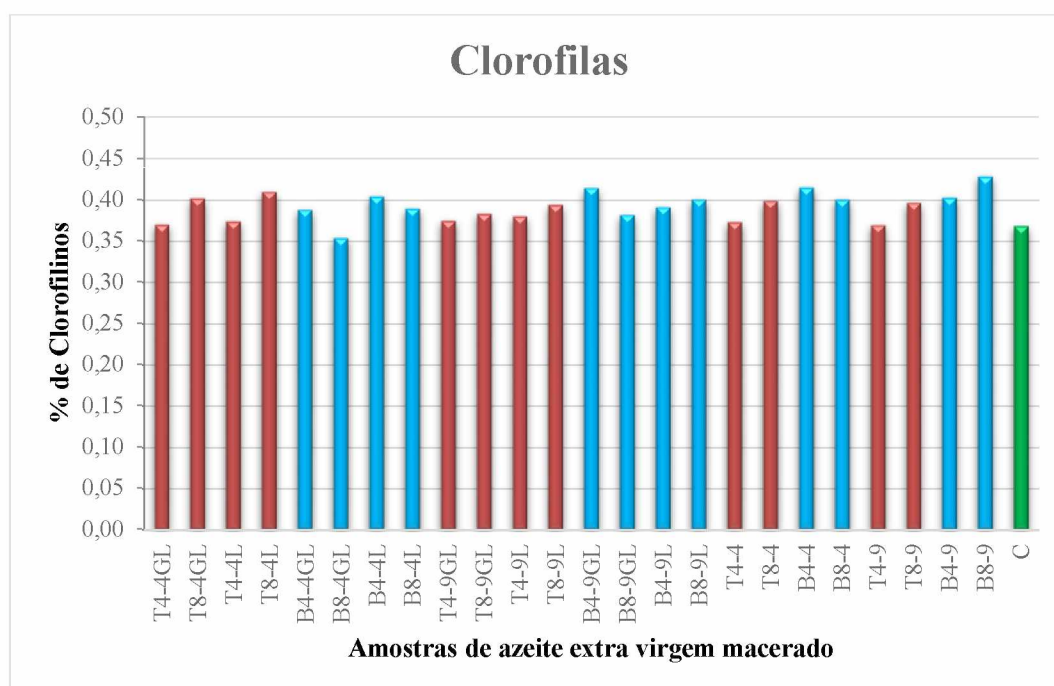


Figura 21 - Valores médios dos resultados das determinações dos Pigmentos clorofilinos.

4.4.7. Cor

O azeite virgem extra tem uma cor que vai desde o verde-amarelado até ao dourado, dependendo da variedade e do estado de maturação da azeitona. A cor do azeite, um dos atributos básicos para avaliar a sua qualidade, é determinada pelos pigmentos existentes na sua composição. O azeite contém dois tipos de pigmentos: as clorofilas e os carotenoides (Boskou, 1998). A medição da cor, pelo método CIELAB, decorre sob a leitura dos parâmetros L^* , a^* e b^* , onde cada um distingue intervalos de cores primárias. O parâmetro L^* que mede a luminosidade e que varia entre zero (preto) e cem (branco); o parâmetro a^* que apresenta o desvio da cor entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos) e o parâmetro b^* que apresenta o desvio da cor entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Silva, et al., 2007). Melgosa, et al. (2004), estudaram 1700 amostras de azeite virgem com a finalidade de propor uma escala uniforme da cor para os parâmetros L^* , a^* , b^* .

O gráfico relativo ao parâmetro L^* (luminosidade), figura 22, indica-nos que as amostras que permaneceram à luz perderam parte dos compostos que lhe dão cor, o que significa que ficaram mais claros (valores superiores de L^*). Este facto também se relaciona com os valores de a^* , figura 23 e b^* , figura 24, obtidos para as amostras, indicando que as que

permaneceram na ausência de luz são mais verdes (valores de a^* mais negativos) e (valores de b^* mais positivos).

De acordo com a figura 22, verifica-se que ao fim de 30 dias de exposição à luz artificial, todos os azeites estão mais claros do que os mantidos na ausência de luz mas semelhantes ao da amostra controlo. Estes resultados podem significar a solubilização de compostos para o azeite, a partir dos aromatizantes adicionados e que, inicialmente não se encontravam na amostra controlo.

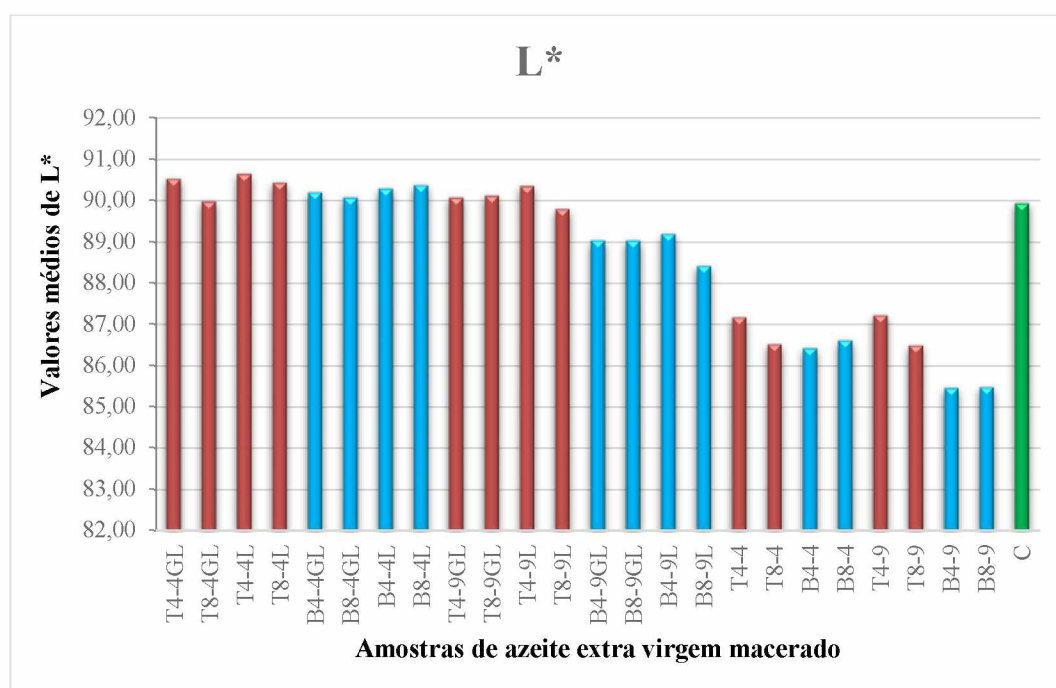


Figura 22 - Valores médios dos resultados das determinações do parâmetro L^* .

De acordo com o gráfico da figura 23, os valores encontrados para a^* são negativos ($-a^*$), indicativos da presença da tonalidade verde, fato que pode ser explicado pela coloração esverdeada do azeite extra virgem promovida pelos pigmentos clorofilinos.

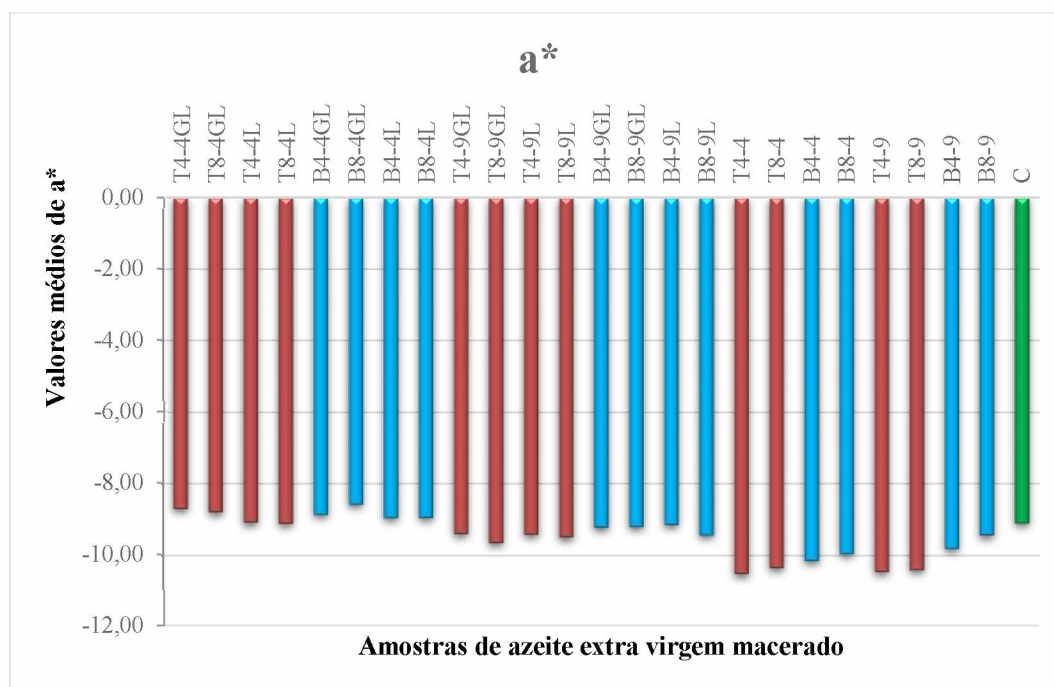


Figura 23 - Valores médios dos resultados das determinações do parâmetro a^* .

Estes valores estão de acordo com os obtidos para os pigmentos clorofilinos, indicando que não houve uma perda significativa destes compostos, mesmo quando as amostras foram expostas à luz, com ou sem partículas de ouro.

Os valores encontrados para o parâmetro b^* nas amostras do presente ensaio e que indicam o tom amarelado estão de acordo com o teor de carotenóides analisados nas amostras. Assim, verifica-se que as amostras maceradas mantidas na ausência de luz apresentam um tom amarelado mais intenso que as amostras mantidas à luz, com ou sem ouro, e mesmo superiores ao da amostra controlo o que reforça a ideia da solubilização de compostos carotenóides durante a maceração dos azeites com as trufas negras e os *Boletus* (figura 24).

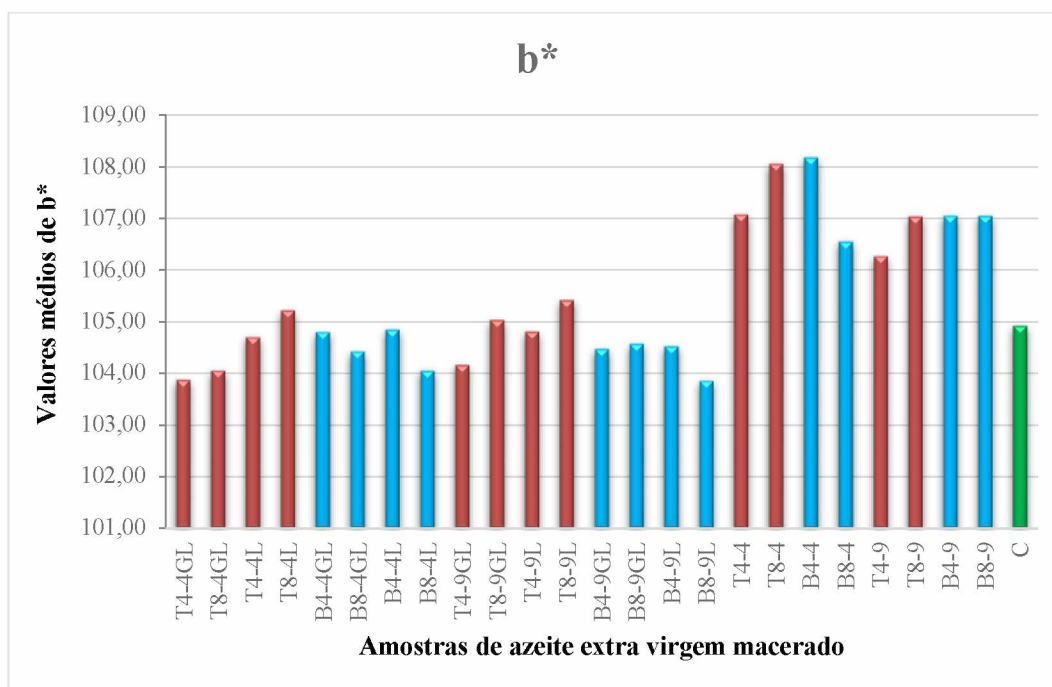


Figura 24 - Valores médios dos resultados das determinações do parâmetro b*.

4.5. Criação da marca e estratégia de Marketing

Segundo a AMA (American Marketing Association) “O Marketing é a atividade, conjunto de órgãos e processos para criar, comunicar, entregar e trocar ofertas que tenham valor para os clientes, parceiros e sociedade no geral.

Todo e qualquer produto que se pretenda vender deve ter uma boa estratégia de marketing associada. De nada serve ter um bom produto se este não chegar ao conhecimento do consumidor. Facto é que existem produtos no mercado que têm bastante sucesso de vendas com uma qualidade que não o justifica e, por outro lado, existem bastantes produtos com uma qualidade considerável, e que até podem ter uma boa relação qualidade-preço, mas devido a uma má estratégia de marketing ou à falta de investimento neste sentido, não têm o sucesso de mercado correspondente à qualidade do produto. Neste sentido, optei por criar para os produtos desenvolvidos uma estratégia de marketing com os seguintes critérios definidos:

- Classe do produto (corrente, *gourmet* ou *premium*);
- Preço;
- Público-alvo;
- Mais-valias do produto;
- Marca;
- Rótulos;

Este produto estará, em termos de marketing, classificado como produto *gourmet*, estará quase obrigatoriamente associado um preço elevado uma vez que se pretende vender em lojas gourmet, feiras da especialidade, restaurantes e hotéis de luxo, visto ser considerado um produto extravagante.

Visto ser um produto Gourmet para uma classe social mais exigente onde são utilizados produtos de extrema qualidade tais como azeite Extra virgem da melhor qualidade, Trufas Negras, cogumelos *Boletus Edulis* e ouro comestível, o preço de garrafas de 100 ml, pode variar entre 12 e 16€ aproximadamente, como é o caso do Club Gourmet do El Corte Inglés que oferece azeites aromatizados com aromas trufa negra e branca a preços elevados oriundas de França e Itália.

Capítulo 5. Conclusões

O azeite é um produto largamente produzido e consumido ao longo dos tempos na cozinha mediterrânica, sendo bastante apreciado pelas suas características organoléticas, bem como pelas suas propriedades nutricionais. A oxidação lipídica do azeite faz diminuir as suas qualidades nutricionais e organoléticas. Assim, o azeite virgem aromatizado com especiarias surge como forma de contrariar essas perdas, e por vezes, aumentar o tempo de prateleira.

Após a realização do ensaio pode concluir-se que a adição de aromatizante fresco, *Tuber melanosporum* (com elevado teor de humidade) afetou negativamente os azeites macerados, tendo promovido a reação de hidrólise com a consequente libertação de ácidos gordos e aumento da percentagem de acidez das amostras. Para o aromatizante *Boletus edulis* (aromatizante desidratado) não se verificou esta degradação. O comportamento da atividade antioxidante ou pró-oxidante dos aromatizantes e da adição de ouro quando as amostras estiveram expostas à luz não foi claro, parecendo, no entanto, não terem prejudicado o azeite. Pode mesmo talvez dizer-se que, pelo facto de não ter havido uma degradação oxidativa considerável das amostras expostas à luz, ao contrário do que era de esperar, a adição dos aromatizantes possam exercer uma ação benéfica na desaceleração desta reação. As diferenças foram mais acentuadas ao nível dos pigmentos carotenóides e, consequentemente, do parâmetro b^* da côr. Neste sentido verificou-se um aumento do teor de carotenóides nas amostras mantidas na ausência de luz, em comparação com a amostra inicial de controlo, o que indica a possível solubilização destes compostos a partir dos aromatizantes testados para o azeite, o que é benéfico para o produto final.

Globalmente, os resultados obtidos permitem afirmar que a adição de agentes aromatizantes não alterou significativamente os parâmetros de qualidade dos azeites, podendo travar a sua degradação oxidativa e, consequentemente favorecer um aumento do tempo de prateleira do produto, especialmente com a adição dos aromatizantes desidratados. O facto de ter aumentado o teor de carotenos das amostras é positivo devido ao seu papel benéfico em termos nutricionais, no entanto, para que se mantenha este aspeto positivo da maceração é necessário que os azeites sejam comercializados em embalagens opacas, que não sofram a influência da luz. Pode ainda concluir-se que a

adição de ouro não afetou negativamente a degradação do azeite, pelo que poderá ser utilizado como aditivo sem prejudicar o tempo de prateleira dos produtos, se expostos à luz nas superfícies comerciais

Para a criação e lançamento destes novos azeites no mercado é necessário que, futuramente, se continuem a analisar outros parâmetros químicos e outras condições de ensaio e, especialmente, que se teste a aceitação por parte dos consumidores, a partir da análise sensorial dos produtos selecionados.

Os dados obtidos neste trabalho contribuíram para o enriquecimento da literatura científica na área, abrindo portas a melhorias e novos trabalhos relacionados com o tema.

Bibliografia

1. Alter, M., & Gutfinger, T. (1982). *Phospholipids in Several Vegetable Oils*. Revista Italiana delle Sostanze Grasse, 59, 14-18.
2. APN - Associação Portuguesa dos Nutricionistas (2017). *Dieta Mediterrânea*.
3. Aragão, L. (2005). “*Virgem Extra impulsiona Azeite*”.
4. Antoun, N., & Tsimidou, M. (1997). *Gourmet olive oils: stability and consumer acceptability studies*. *Food Research Internacional*, 30, 131-136.
5. Baiano, A., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2010). *Aromatization of olive oil*. *Transworld Research Network*, 661, 1-29.
6. Baer, I. (2006). *Contribuição para o estudo da degradação oxidativa de azeites virgens provenientes das cultivares cordovil de Serpa, galega vulgar e verdeal alentejana*. Tese para obtenção do grau de Mestrado em olivicultura, Azeite e Azeitona de mesa. U.T.L./I.S.A, Lisboa.
7. Baer, I. (2012). *Tecnologia dos Azeites e Óleos Vegetais* – Manual de apoio as aulas teóricas. Escola Superior Agrária de Beja.
8. Barberán, T. (s.d.). *Los polifenoles de los alimentos y la salud*. *Alim. Nutri. Salud*, 10, pp. 4153.
9. Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., & Notte, E.L. (2009). *Changes in Quality Indices, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Flavored Olive Oils during Storage*. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 86, 1083-1092.
10. Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (Eds.). (2009). *Food Chemistry* (4th edition). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
11. Bianco, A., Melchioni, C., Romeo, G., Scarpati, M.L., & Uccella, N. (1998). *Microcomponents of olive oil - III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl) ethanol*. *Food Chemistry*, 63, 461-464.
12. Boskou, D. (1996). *Olive Oil: Chemistry and Technology* (Boskou, D., Vol. 41, pp.

101-120). Champaign: AOCS Press.

13. Boskou, D. (2008). Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Minor Constituents and Health* (pp. 11-44). CRC Press.

14. Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). *Olive Oil Composition. Olive Oil Chemistry and Technology* (Second Edi., pp. 41-76). AOCS Publishing.

15. Boukhchina, S., Sebai, K., Cherif, A., Kallel, H., & Mayer, P.M. (2004). *Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils by LC-MS and LC-MS-MS. Canadian Journal of Chemistry*, 1215, 1210-1215.

16. Baptista, P. (2010) - *Autenticidade de cogumelos silvestres por métodos moleculares*. In Curso de Autenticidade de Produtos Alimentares. Bragança.

17. Costa, H. (2012). *Azeites Aromatizados: Estudo da Influência do agente aromatizante na composição química e resistência à oxidação*. Tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança.

18. Covas, M (2007), *Olive oil and the cardiovascular system*, Pharmacological Research 55: 175–186.

19. Cunha, S. C. (2007). *“Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas”*. Dissertação de Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Pág. 1723.

20. Custódio, T. A. (2009). *“Azeites extra virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos da qualidade”*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Pág. 9-11; 24-26; 29-30.

21. Casa do Azeite. Disponível em <http://www.casadoazeite.pt/>. Consultado a 10 de fevereiro de 2017.

22. Duarte, A. P. C. (2003). *Estudo sobre a Influência de Dietas com Gorduras Ricas em Ácidos Monoinsaturados nalguns Parâmetros Hemáticos do Murganho em Condições de Diabetes mellitus*. Trabalho de Fim de Curso de Engenharia de Agroindustrial, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

23. Earle, M (1997), *Innovation in the food industry*, Trends in Food Science & Technology Vol. 81.

24. Damechki, M., Sotiropoulou, S., & Tsimidou, M. (2001). *Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils*. *Grasas y Aceites*, 52, 207213.
25. Firestone, D. (2005). Olive Oil. In F.Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volumes 1-6* (6th Edition, pp. 303-331). John Wiley & Sons.
26. Fungipedia, 2017 (<https://pt.fungipedia.org/cogumelos/boletus-edulis.html>)
acedido a 18 de fevereiro de 2017.
27. Fernandes, M. O. (2010). *A Dieta Mediterrânica: uma porta aberta para novos mercados*. O caso do Azeite. Obtido de Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares:
http://www.observatorioagricola.pt/pormenor.asp?id_rubrica=121&id_seccao=41, acedido a 8 de Fevereiro de 2017.
28. Gallo, (2017). Obtido de <http://www.gallooliveoil.com/>, acedido em 4 de fevereiro de 2017.
29. Gonçalves, J. (2014). *O conceito de Dieta Mediterrânica e a pirâmide alimentar mediterrânica*. Obtido de Fundação Portuguesa de Cardiologia:
<http://www.fpcardiologia.pt/o-conceito-de-dieta-mediterranica-e-piramide-alimentarmediterranea/>, em 11 de janeiro de 2017.
30. Gouveia, J., Saldanha, J., Martins, A., Modesto, L., Sobral, V. (2002). *O azeite em Portugal*. Edições Inapa, Lisboa.
31. Gouveia, J. (1995). *“Azeites virgens do Alto Alentejo – comportamento químico, tecnológico e sensorial”*. Dissertação para obtenção de grau de doutor. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
32. GIUFFRIDA, D.; SALVO, F.; SALVO, A.; PERA, L. L.; DUGO, G. *Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties*. *Food chemistry*, n. 101, p. 833-837, 2007.
33. Gambacorta, G., Faccia, M., Pati, S., Lamacchia, C., Baiano, A. & La Notte, E. (2007). *Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage*. *Journal of Food Lipids*, 14, 202-2015.
34. Gonzalez, P., Mauriz, J. L.; González-Gallego, J. Shock Hemorrágico y Radicales Libres: *Papel Protector de la Glicina*. In: Marroni, NP. et al. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Porto Alegre, 2002 p.63-78.

35. Granados, J. A. (2000). *Enciclopedia del Aceite de Oliva, Historia y Leyendas del aceite y la Aceituna*. Editorial Planeta, Barcelona, 109-114; 357-372. ISBN: 84 08-03542-8.
36. Gunstone, F (2002); *Vegetable oils in food technology: Composition, Properties and Uses*, Blackwell Publishing, 1ª Edition .
37. Heinonen, M 2007. *Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective*. Review, Mol Nutr Food Res 51:684 – 691
38. Huang, L; Bauer S, (2008), *Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health*, American College of Surgeons 407-416.
39. Harwood, J., & Aparício, R. (1999). Handbook of olive oil, analysis and properties (1st edition, p. 638). Springer.
40. Issaoui, M., Flamini, G., Hajaij, M.E., Cioni, P.L., & Hammami, M. (2011). *Oxidative Evolution of Virgin and Flavored Olive Oils Under Thermo-oxidation Processes*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 88, 1339-1350.
41. Jorge, V. (2009). *“Novo Azeite Virgem Extra Almojanda com Malagueta”*. http://www.hipersuper.pt/2009/10/19novo_azeite_virgem_extra_almojanda_com_malagueta. 27/Feveiro/2010.
42. Kiritsakis, K.; Kyritsakis, A.; Mavroudi, N. (2001). *Fats and Oils. In The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion*. Ed. Matalas, A.-L.; Zampelas, A.; Stavrinos, V.; Wolinsky, I.; CRC Press, Boca Raton, 77-96. ISBN: 0-8493-0110-6.
43. Kiritsakis, A; Christie, W. W. (2000). *Analysis of Edible Oils*. In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties. Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, 129-158. ISBN: 0-8342-1633-7.
44. Kiritsakis, A (1998). Olive oil: From the tree to the table. Second Edition Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, 006611, USA.
45. Kiritsakis, A. K. (1992). *El Aceite de Oliva*. A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid, 45-76; 77-82; 83-102; 131-156; 157-162; 163-180, ISBN: 84-87440-28-2.

46. Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). *Review - Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*. *Prog Lipid Res.*, 46, 244–282.
47. Mariz, I.F.A., Pais, L.S., Barreiro, F.F., & Silva, J.A.C. (2005). *Equilibrium Moisture Content and Heat of Desorption of Garlic*. In 9th International Chemical Engineering Conference. CHEMPOR/05. Coimbra
48. Melgosa, M., & Huertas, R. (2004). *Proposal of a Uniform Color Scale for Virgin Olive Oils*. *JAOC*, 81, pp. 323-330.
49. Maia, F. M. (2014). *Estudos de estabilidade oxidativa em azeites monovarietais*. Tese de mestrado da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.
50. Mînguez-Mosquera, et.al (1991), *Color Pigment Correlation in Virgin Olive Oil*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68, 332-336.
51. Manuel da Cruz Martins (Coimbra, 13 de Dezembro de 1999, http://www.drapc.minagricultura.pt/base/documentos/boletus_edulis.htm). Acedido em 15 de Fevereiro de 2017.
52. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T.C. (2000). *The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation, Heart Disease*. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
53. Moldão-Martins, M., Beirão-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., & Beirão-da-Costa, M.L. (2004). *Olive oil flavoured by the essential oils of Mentha piperita and Thymus mastichina L. Food Quality and Preference*, 15, 447-452.
54. Negishi, O., Negishi, Y., & Ozawa, T. (2002). *Effects of food materials on removal of allium-specific volatile sulfur compounds*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3856–3861.
55. Natursan, <https://www.natursan.net/informacion-nutricional-setas-hongos/>, acedido em 14 de janeiro de 2017.
56. O'Brien, R. D. (2009). *Fats and Oils Formulating and Processing for Applications*. 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, 166-167. ISBN: 1-42006-166-6.
57. Perrin, J. L. (1992). *Les Composés Mineurs et les Antioxygènes Naturels de l'Olive et de son Huile*. *Revue Française des Corps Gras*, 39 (1/2): 25-32.

58. Paraskevopoulou, D.; Boskou, D.; Paraskevopoulou, A. (2007), *Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides*; Food Chemistry 101: 1197–1204
59. Ramírez-Tortosa, M.C., Granados, S., & Quiles, J.L. (2006). *Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil. Olive oil and health* (pp. 45-61). CAB International.
60. Regulamento (CE) nº 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003.
61. Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991.
62. Regulamento (UE) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro de 2011.
63. Regulamento de Execução (UE) N.º 1348/2013 DA COMISSÃO de 16 de dezembro de 2013., acedido a 10 de Dezembro de 2016.
64. Ryan, D; Robards, K. & Lavee S. (1998). *Evaluación de la calidad del aceite de oliva*. Olivae, revista do Conselho Oleícola Internacional, Madrid, nº 72: 23-39.
65. Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001). *Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 78, 881-888.
66. Santinelli, F., Damiani, P., & Christie, W.W. (1992). *The triacylglycerol structure of olive oil determined by silver ion high-performance liquid chromatography in combination with stereospecific analysis*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 69, 552-556.
67. Silva, L. M. (2008). *Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos*. Tese de mestrado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, p. 14
68. Silva, R. A.; Petter, C. O.; Schneider, I. A.H. (2007) *Avaliação da perda da coloração artificial de agatas*. REM: R.Esc.Minas, v.60, n.3, p.477-482
69. Samir, M (2002) *Revista da casa do azeite*, Numero 1, Outubro 2002.

70. Shahidi, F; Zhong, Y (2005), *Lipid Oxidation: Measurement Methods*, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume.
71. Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.
72. Salguero, D. G. (2014). *Determinación de la capacidad antioxidante del aceite híbrido de palma en diferentes estados de maduración*. Obtenção do grau de Nutricionista Dietista na Faculdade de Ciências-Universidade Javeriana, p. 63.
73. Silver Colloids, (<http://www.silver-colloids.com/about.html>), consultado em fevereiro de 2017.)
74. Sánchez, J.L., Carretero, A.S., & Gutiérrez, A.F. (2001). *Composición del aceite de oliva*. In I. Omega 3 & F. Puleva (Eds.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario* (pp. 195-224). Granada.
75. Tiscornia, E., Forina, M., & Evangelisti, F. (1982). *Chemical composition of olive oil and variations induced by refining. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 59, 519-556.
76. Tuck, K.L., & Hayball, P.J. (2002). *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636-644.
77. Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., & Galli, C. (2006). *Antioxidant Properties of Olive Oil Phenolics. Olive oil and health* (pp. 109-116). CAB International.
78. 1348/2013, R. d. (16 de Dezembro de 2013). Que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. Jornal Oficial da União Europeia L 338/31.

